UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS CLÍNICAS



TESIS DOCTORAL

CARACTERIZACIÓN DE MECANISMOS DE RESISTENCIA A QUINOLONAS Y A OTROS ANTIMICROBIANOS EN CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* Y OTRAS ESPECIES DE ENTEROBACTERIAS

JOSÉ RUIZ HIERREZUELO

Las Palmas de Gran Canaria, 1999

14/1999-00

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
UNIDAD DE TERCER CICLO Y POSTGRADO

Reunido el día de la fecha, el Tribunal nombrado por el Excmo. Sr. Rector Magfco. de esta Universidad, el/a aspirante expuso esta TESIS DOCTORAL.
Terminada la lectura y contestadas por el/a Doctorando/a las objeciones formuladas por los señores miembros del Tribunal, éste calificó dicho trabajo con la nota de Sobresaliente CUM LAUDE

Las Palmas de Gran Canaria, a 13 de diciembre de 1999.

El/a Presidente/a: Dr.D. Pedro Betancor León,

El/a Secretario/a: Dr. D. José Luis Pérez Arellano,
Suplente: Dra. Elena Castellano
Elena Castellano

El/a Vocal: Dr.D. Antonio Manuel Martín Sánchez,

El/a Vocal: Dr.D. Jordi Vila Estapé,

El/a Vocal: Dra.Dña. Mariagrazia Perilli,

El Doctorando: D. José Ruiz Hierrezuelo,



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS CLÍNICAS

CARACTERIZACIÓN DE MECANISMOS DE RESISTENCIA A QUINOLONAS Y A OTROS ANTIMICROBIANOS EN CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* Y OTRAS ESPECIES DE ENTEROBACTERIAS

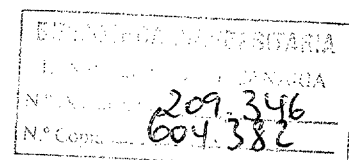
Memoria de la tesis doctoral realizada en el Departamento de Ciencias Clínicas de la Facultad de Ciencias Médicas y de la Salud de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, que presenta el licenciado JOSÉ RUIZ HIERREZUELO para optar al GRADO DE DOCTOR.

La directora de la tesis

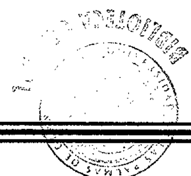
Dra. Mª del Mar Tavío Pérez

El doctorando

José Ruiz Hierrezuelo



Las Palmas de Gran Canaria, a 25 de Octubre de 1999



MARÍA DEL MAR TAVÍO PÉREZ, PROFESORA DEL ÁREA DE MICROBIOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS CLÍNICAS DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA,

CERTIFICA:

Que la tesis doctoral titulada:

CARACTERIZACIÓN DE MECANISMOS DE RESISTENCIA A QUINOLONAS Y A OTROS ANTIMICROBIANOS EN CEPAS DE ESCHERICHIA COLI Y OTRAS ESPECIES DE ENTEROBACTERIAS

Presentada por el Licenciado en Farmacia José Ruiz Hierrezuelo para optar al Grado de Doctor, ha sido realizada en el departamento de Ciencias Clínicas de la Facultad de Ciencias Médicas y de la Salud de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria bajo mi dirección.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Las Palmas de Gran Canaria, a 25 de Octubre de 1999.

Dra. María del Mar Tavío Pérez

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincera gratitud ...

A la Dra. María del Mar Tavío Pérez, por sus enseñanzas y constante dedicación en la dirección de esta tesis.

A la Sociedad Española de Quimioterapia que, bajo la presidencia del Prof Dr. José Ángel García Rodríguez, en su IV Congreso Nacional celebrado en Octubre de 1996 en Bilbao, concedió el premio Martín-Luengo a la mejor comunicación del Congreso por un trabajo de investigación emanado de esta tesis, cuya cuantía ha servido para sufragar diversos gastos necesarios para la final consecución de la misma.

Al Profesor Dr. Antonio Manuel Martín Sánchez por sus notables sugerencias en la elaboración de esta tesis. Al Profesor Dr. Zoilo González Lama como tutor del programa de doctorado.

Al Profesor Dr. Jordi Vila, por sus valiosos consejos científicos y por cuanto de él hemos aprendido en la resistencia bacteriana a quinolonas.

Al Dr. Joaquim Ruiz, por su inestimable labor científica en la determinación de las mutaciones en la ADN girasa y topoisomerasa IV bacterianas. Así como al Servicio Científico y Técnico de la Universidad de Barcelona por su contribución en la secuenciación del ADN.

Al Departamento de Microbiología del Hospital Clínic i Provincial de Barcelona por haber realizado la determinación del serotipo de la cepa *Salmonella enteritidis.*

A la Unidad de Histología del Departamento de Morfología, a sus profesores, a sus doctorandos y al personal de laboratorio por su colaboración en la realización de las diferentes fotos de las tinciones de Gram. Gracias, Mary Luz y Mª del Mar, por el tiempo que nos dedicasteis para que pudiéramos conocer el manejo de la cámara Leitz Orthomat acoplada a vuestro microscopio óptico Leitz Orthotlan.

Al Laboratorio de Bioquímica del Departamento de Endocrinología Celular y Molecular, por haberme facilitado el uso de su autoclave cuando el nuestro estaba averiado.

A mi compañera de tesis la Dra. Leticia Bueno Marrero por tantos momentos que compartimos en el desarrollo de nuestras respectivas tesis en el Área de Microbiología de la Facultad de Ciencias de La Salud.

A los Servicios de Microbiología y de Farmacia del Hospital Insular de Gran Canaria por su ayuda material.

Al Prof. Dr. Federico Uruburu y al Dr. M. Derlyn por las cepas de control que amablemente nos donaron.

Y finalmente, aunque no en último lugar, a la Dra. Eloísa Llavero Ruiz por su apoyo y comprensión durante todos estos años.

OBJETIVOS

El desarrollo del trabajo de investigación que constituye esta tesis fue en gran medida motivado por el incipiente uso clínico de las fluoroquinolonas que acontecía a principios de la década de los noventa. En aquellos momentos hacía menos de cinco años que se había autorizado en España la comercialización de la norfloxacina y la ciprofloxacina; la ofloxacina comenzaba a introducirse en clínica y en diferentes laboratorios farmacéuticos se estaban desarrollando nuevas moléculas de fluoroquinolonas con mejor farmacocinética, espectro más amplio y mayor eficacia antibacteriana. En el seno de este panorama varias fueron las cuestiones que se intentaron ir respondiendo con el desarrollo de esta tesis. En concreto:

1. El nivel de actividad de las fluoroquinolonas comercializadas y de otras que en aquellos momentos aún estaban en fases de ensayo clínico frente a aislamientos clínicos de *Escherichia coli*.

2. Valorar la aparición de posibles cepas clínicas resistentes a fluoroquinolonas, así como desarrollar mutantes con alto nivel de resistencia a fluoroquinolonas, con el objeto de investigar en uno y otro tipo de cepas los mecanismos conducentes a ese alto nivel de resistencia.

3. Conocer si el alto nivel de resistencia a fluoroquinolonas iba apareado a la aparición de fenotipos de múltiple resistencia a antimicrobianos de diferentes familias y no sólo a quinolonas. Si ello fuera así, profundizar en las causas de esa multirresistencia.

4. Valorar la aparición de posibles cambios en la expresión de las proteínas y del lipopolisacárido de la membrana externa asociados a la aparición de resistencia a fluoroquinolonas y/o multirresistencia en cepas de *E coli*. Así como conocer las posibles variaciones en la acumulación de fluoroquinolonas, en la célula bacteriana, asociadas o no a cambios en la membrana externa bacteriana.

5. Comparar la capacidad de las fluoroquinolonas de seleccionar mutantes resistentes en cepas de *E. coli* respecto a otras especies de enterobacterias.

6. Estudiar las posibles homologías en cuanto a cambios en las proteínas y en el lipopolisacárido de la membrana externa entre mutantes resistentes a quinolonas de diferentes especies de enterobacterias y mutantes resistentes de la especie *E. coli*.

7. Analizar el papel de los factores determinantes en la acumulación de las fluoroquinolonas en la célula bacteriana respecto de otros mecanismos en el desarrollo de resistencia a quinolonas en cepas de *E. coli*.

8. Comparar la frecuencia y los fenotipos de los mutantes resistentes de *E. coli* desarrollados con fluoroquinolonas con las frecuencias y fenotipos de los mutantes resistentes de *E. coli* desarrollados con otro tipo de antimicrobianos de amplio espectro, en concreto con ceftazidima.

Sumario

Agradecimientos IX
Objetivos X
Sumario XI

SECCIÓN 1 — INTRODUCCIÓN 1

CAPÍTULO1: CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LAS BACTERIAS 3

1. Historia 3
    1.1 Clasificación de las bacterias 4

2. Familia *Enterobacteriaceae*. Características generales. 5
    2.1 Nomenclatura y clasificación 5
    2.2 Descripción de la familia 6
    2.3 Características bioquímicas e identificación 7
    2.4 Características antigénicas 9
    2.5 Factores de patogenicidad o virulencia 10
        2.5.1 Producción de exotoxinas 10
        2.5.2 Expresión de factores de adherencia 10
        2.5.3 Factores genéticos 10
        2.5.4 Resistencia a los antimicrobianos 10

3. Género *Escherichia. Escherichia coli* 11
    3.1 Características y Epidemiología 11
    3.2 Determinantes de la acción patógena 11
    3.3 Patología. Síndromes clínicos 12
        3.3.1 Gastroenteritis 12
        3.3.2 Infecciones del tracto urinario 12
        3.3.3 Meningitis neonatal 13
        3.3.4 Septicemia 13
        3.3.5 Otras infecciones 13

4. Género *Enterobacter*. 14
    4.1 Morfología y características bioquímicas 14
    4.2 Epidemiología 14
    4.3 Patología 14

5. Género *Citrobacter*. 18
5.1 Morfología 18
5.2 Características bioquímicas 18
5.3 Epidemiología 18

6. Género *Klebsiella*. 21
6.1 Morfología y bioquímica 21
6.2 Patología 21
6.3 Diferenciación bioquímica, antígenos y biotipos 21

7. Género *Proteus*. 26
7.1 Morfología y fisiología 26
7.2 Pruebas bioquímicas 26
7.3 Serotipos y antigenicidad 26
7.4 Resistencias intrínsecas 27
7.5 Epidemiología y síndromes clínicos 27
7.6 Taxonomía 28
Proteus vulgaris 28

8. Género *Salmonella*. 30
8.1 Morfología y Fisiología 30
8.1.1 Características bioquímicas 30
8.1.2 Características antigénicas 30
8.2 Síndromes clínicos 31
8.3 Epidemiología 31

CAPÍTULO 2: LA PARED CELULAR BACTERIANA. 33

Componentes de la pared celular en bacterias gramnegativas 35

1 Peptidoglicano 35

2 Periplasma 37

3 Membrana externa 37

3.A) El lipopolisacárido (LPS) 38
Mecanismo de acción del LPS como endotoxina 41
3.B) Proteínas 42

Porinas 42
Las porinas OmpC y OmpF 45
Biosíntesis de las porinas OmpF y OmpC y su papel en la resistencia a antimicrobianos. 53
Proteínas de canal específico 54
3.C) La importancia como barrera de la membrana externa 57

Resistencia debida a la baja permeabilidad de la membrana 60
Mecanismos internos de resistencia 61
Resistencia por impermeabilidad a las quinolonas 62
Nuevas estrategias para superar la barrera de la membrana externa 63
Incidencia clínica de la impermeabilidad de la membrana externa 63

CAPÍTULO 3: MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS 65

1 Introducción 65

2 Tipos de resistencia 66
2.A Resistencias cromosómicas: Mutación 66
2.B Resistencias extracromosómicas 67
2.B.1. Transformación 67
2.B.2. Transducción 68
2.B.3. Conjugación 68

3 Principales Mecanismos de Resistencia 70
3.A Alteración en la permeabilidad, captación o acumulación 70
3.B Mecanismos enzimáticos de inactivación 70
3.C Cambios en los puntos de acción o falta de la diana 71

CAPÍTULO 4: CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LOS β-LACTÁMICOS 73

1 Introducción 74
1.A Historia 74
1.B Estructura química 74
1.C Farmacocinética 76
Absorción. 76
Distribución. 76
Metabolismo 76
Excreción 76
1.D Mecanismo de acción de los β-lactámicos. El papel de las Proteínas Fijadoras de Penicilina o PFPs 76

2 Resistencia a β-lactámicos 78
2.A Alteración de la permeabilidad 78
2.B Cambios o ausencia de los sitios de acción (PFPs) o diana. 79
Importancia clínica de las alteraciones de las PFPs en organismos gramnegativos 80
2.C Mecanismos enzimáticos de inactivación (β-lactamasas) 81
2.C.1 Localización de las β-lactamasas 82
2.C.2 Producción de β-lactamasas 87
2.C.3 Codificación de las β-lactamasas 87
2.C.4 Mecanismo de acción 89

2.C.5 Inhibición de las β-lactamasas. 90
Mecanismo de acción. 90
Naturaleza de los inhibidores de las β-lactamasas 91

3 Penicilinas o Penamas 92
3.A Estructura química 92
3.B Clasificación 92
3.C Modo de acción 95

4 Penemas y Carbapenemas 96
4.A Estructura química 96
4.B Propiedades fisicoquímicas 96
4.C Clasificación 96
4.D Modo de acción 97

5 Monobactamas 98
5.A Estructura química 98
5.B Modo de acción 98

6 Cefalosporinas 99
6.A Estructura química 99
6.B Propiedades fisicoquímicas 100
6.C Clasificación 100
6.D Modo de acción 107
6.C Farmacología 107
Absorción 107
Distribución 107
Eliminación: metabolismo y excreción 108
6.F Espectro de actividad 108
6.G Toxicidad y efectos secundarios 110

7 Inhibidores de las β-lactamasas 111
7.A Estructura química 112
7.B Propiedades fisicoquímicas 112
7.C Clasificación 112
7.D Modo de acción 114

CAPÍTULO 5: CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LAS QUINOLONAS 117

1 Introducción 117
1.1 Historia 117
1.2 Estructura química 118
1.3 Propiedades fisicoquímicas 119
1.4 Clasificación 119

2 Actividad antibacteriana 125

3 Mecanismo de acción 129
3.1 Otros efectos inducidos por las quinolonas: La respuesta SOS. 130

4 Mecanismos de Resistencia a Quinolonas 133
4.1 Mutaciones que afectan a la ADN girasa bacteriana 136
4.1.1 Papel de la ADN girasa en el metabolismo bacteriano 136
4.1.1.1 Consecuencias de la alteración de la subunidad A (GyrA) ... 136
4.1.1.2 Consecuencias de la alteración de la subunidad B (GyrB) 137
4.1.1.3 Alteración del acoplamiento de la molécula quinolónica a la ADN girasa por mutaciones en los genes *gyrA* y *gyrB* ... 138
4.1.1.4 Mutaciones en *parC* y *parE* 138
4.2 Importancia de la permeabilidad de la membrana externa 139
4.2.1 Papel de los componentes de la membrana externa en la entrada de las moléculas de quinolonas en la célula bacteriana 139
4.2. 2 Alteración de las proteínas de la membrana externa y del LPS en *Escherichia coli* 140
.... 141
4.3 Papel del transporte transmembrana protóndependiente en la resistencia a quinolonas 141

5 Farmacocinética 144
Absorción 144
Distribución 144
Eliminación: Metabolismo y Excreción 145

6 Toxicidad 146

7 Interacciones 148

8 Indicaciones y Usos 148
8.1 Indicaciones en la infancia y como profilaxis quirúrgica 150
8.2 Usos en veterinaria y alimentación animal 151

9 Nuevos Agentes 152

SECCIÓN 2 — MATERIAL Y MÉTODOS 155

CAPÍTULO 6: MATERIAL Y MÉTODOS 157

6.1 Identificación bacteriana. Medios de siembra 158
6.1.1 Medios de Identificación 158
Sistema API 20 E 158
6.1.2 Medios de siembra 158

6.1.2.1 Medios de agar 158
Agar de infusión de cerebro y corazón en pico de flauta. 158
Agar de MacConkey 159
Agar de Mueller Hinton 159
6.1.2.2 Caldos de cultivo 160
Medio Antibiótico nº 3 160
Infusión de cerebro y corazón 160
Caldo de Mueller Hinton 160
Caldo de Mueller Hinton con 15% de glicerol 161
Antimicrobianos utilizados en este estudio 161
Reactivos utilizados en este estudio 162

6.2 Estudio de Susceptibilidades a los Antimicrobianos 163
6.2.1 Test de Dilución en Agar 163
6.2.2 Test de Difusión en Agar 165

6.3 Selección *In Vitro* de Colonias Resistentes a las Quinolonas y a la Ceftazidima .. 167

6.4 Estudio de las Proteínas de la Membrana Externa 168
6.4.1 Extracción de las Proteínas de la Membrana Externa. 168
6.4.2 Cuantificación de Proteínas mediante el Método de Lowry 168
6.4.3 Separación de las Proteínas de la Membrana Externa mediante Electroforesis en Geles de Poliacrilamida 168
6.4.4 Desecado de Geles de Poliacrilamida 169

6.5 Estudio de Densitometría 170

6.6 Estudio de los lipopolisacáridos de la membrana externa 171
6.6.1 Extracción de los lipopolisacáridos de la membrana externa 171
6.6.2 Resolución de los lipopolisacáridos. Separación en geles de poliacrilamida 171
6.6.3 Tinción de plata con la Técnica de Tsai y Frasch 172

6.7 Valoración de la acumulación de la norfloxacina en la célula bacteriana. Técnica del bioensayo 173
6.7.1 Técnica de obtención de los sobrenadantes con norfloxacina intracelular acumulada 173
6.7.2 Técnica del Bioensayo 174

6.8 Valoración del efecto de un inhibidor del gradiente protónico transmembrana en la susceptibilidadde las cepas a diferentes antimicrobianos 175

6.9 Estudio de detección de mutaciones en laADN-girasa y topoisomerasa IV bacterianas 175

6.10 Estudio de los cambios morfológicosmediante tinción de Gram 176
6.10.1 Tinción de Gram: Fundamento. Técnica. Valoración mediante microscopio 176

6.11 Caracterización de las β-lactamasas presentes en las cepas origen y en las seleccionadas con ceftazidima 177
6.11.1 Obtención de los extractos enzimáticos crudos 177
6.11.2 Valoración de la actividad específica de los extractos enzimáticos crudos . 177

6.12 Estudio estadístico 178

SECCIÓN 3 — RESULTADOS 181

CAPÍTULO 7: RESULTADOS: IDENTIFICACIÓN, SUSCEPTIBILIDAD Y OTRAS CARACTERÍSTICAS 183

7.1 Identificación Bacteriana 183

7.2 Estudio de susceptibilidad a antimicrobianos en las cepas origen de *Escherichia coli* 184

7.3 Selección de mutantes de *Escherichia coli* con fluoroquinolonas y βlactámicos. Frecuencias de selección 189

7.4 Susceptibilidad de los mutantes de *Escherichia coli* 193

7.5 Estudio estadístico de correlación 197
Test de correlación de Spearman 197

7.6 Susceptibilidades de otras enterobacterias relacionadas y sus mutantes. Frecuencia de selección a quinolonas 213

7.7 Estudio de cambios en la morfologíade las cepas de *E. coli* 218

7.8 Valoración de la actividad hidrolítica de las β-lactamasas presentes en el extracto periplásmico 221

CAPÍTULO 8: RESULTADOS: ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS. 223

8.1 Resumen de los perfiles electroforéticos de las proteínasde la membrana externa (OMP) de las cepas de *E. coli* 223
8.2 Resumen de los perfiles electroforéticos de las proteínas de la membrana externa (OMP) de otras cepas de enterobacterias 224

8.3 Expresión de la porina F (OmpF) en cepas de *Escherichia coli* 249

CAPÍTULO 9: RESULTADOS: ELECTROFORESIS DE LIPOPOLISACÁRIDOS. 245

9.1 Cambios observados en el LPSde la membrana externa delas cepas de *E. coli* 253
9.2 Cambios observados en el LPS de la membrana externa de otras
cepas de enterobacterias 254

9.3 Ventajas del uso del 0,5% de SDS en los geles de poliacrilamida para la
separación del LPS deenterobacterias 267

CAPÍTULO 10: RESULTADOS: ENSAYOS DE ACUMULACIÓN Y SECUENCIACIÓN
DE TOPOISOMERASAS 261

10.1 Ensayos de Acumulación en *Escherichia coli*y otras enterobacterias 269

10.2 Determinación de mutaciones en la ADN-girasa y topoisomerasa IV
en las cepas de *Escherichia coli* 276

SECCIÓN 4 — DISCUSIÓN 269

CAPÍTULO 11: DISCUSIÓN 271

11.1 Estudio de susceptibilidades 279

11.2 Frecuencias de selección y susceptibilidad de las cepas mutantes 287

11.3 Papel de la permeabilidad en el desarrollo de resistencia a quinolonas en *E. coli* . 290

11.4 Papel de la permeabilidad de *E. coli* en el desarrollo de resistencia a
otros antimicrobianos 292

11.5 Papel de los sistemas de expulsión activa en *E. coli* 293

11.6 Influencia de las mutaciones en la ADN girasa y topoisomerasa IV en
el desarrollo de resistencia a quinolonas en *E. coli* 295

11.7 Clasificación de los mutantes 297

11.8 Cambios en la expresión de porinas en *Enterobacter,Citrobacter, Klebsiella*, *Proteus* y *Salmonella* tras selección con norfloxacina y lomefloxacina 300
11.8.1 Comparación del efecto de la Lomefloxacina en la selección de mutantes resistentes en las diferentes especies de Enterobacterias ... 303

11.9 Filamentación y selección con CAZ 306

11.10 Ventajas del uso de 0,5% de SDS en los geles de poliacrilamida para separación del LPS de enterobacterias 307

SECCIÓN 5 — CONCLUSIONES Y BIBLIOGRAFÍA 299

CAPÍTULO 12: CONCLUSIONES 311

BIBLIOGRAFÍA 315

Sección 1
Introducción



1 CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LAS BACTERIAS

1. **Historia.**
   - **1.1 Clasificación de las bacterias.**
2. **Familia *Enterobacteriaceae*. Características generales.**
   - **2.1 Nomenclatura y clasificación.**
   - **2.2 Descripción de la familia.**
   - **2.3 Características bioquímicas e identificación.**
   - **2.4 Características antigénicas.**
   - **2.5 Factores de patogenicidad o virulencia.**
     - **2.5.1 Producción de exotoxinas.**
     - **2.5.2 Expresión de factores de adherencia.**
     - **2.5.3 Factores genéticos.**
     - **2.5.4 Resistencia a los antimicrobianos.**
3. **Género *Escherichia*. *Escherichia coli*.**
   - **3.1 Características y Epidemiología.**
   - **3.2 Determinantes de la acción patógena.**
   - **3.3 Patología. Síndromes clínicos.**
     - **3.3.1 Gastroenteritis.**
     - **3.3.2 Infecciones del tracto urinario.**
     - **3.3.3 Meningitis neonatal.**
     - **3.3.4 Septicemia.**
     - **3.3.5 Otras infecciones.**
4. **Género *Enterobacter*.**
5. **Género *Citrobacter*.**
6. **Género *Klebsiella*.**
7. **Género *Proteus*.**
8. **Género *Salmonella*.**

1. HISTORIA

Hasta 1974 los procariotas aparecieron clasificados dentro del reino *Protistas* hasta que, en esta fecha, aparecen descritos como nuevo reino (*Procaryotae*) en el Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (8ª ed., 1974), separados de su anterior clasificación dentro del reino *Protistas* y conteniendo dos divisiones: Cianobacterias y Eubacterias.

Posteriormente, en el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1ª ed., 1984), ese mismo reino *Procaryotae*, es dividido en cuatro divisiones:

Gracilicutes: Bacterias gramnegativas.
Firmicutes: Bacterias grampositivas.
Tenericutes: Bacterias sin pared celular
Mendosicutes: Bacterias con pared celular sin ácido murámico (Clase *Archaeobacteria*).

Estos cambios en la clasificación bacteriana fueron introducidos basándose en el coeficiente de homología de la secuencia de bases del ADN de las células.

El estudio del sistema genético bacteriano a nivel molecular para establecer la homología entre el ADN celular (composición de por-

centaje básico de ADN) e hibridación de ADN, ha dado lugar a grandes avances en taxonomía bacteriana. Uno de estos estudios es la determinación de la composición de bases de ADN, característica de cada especie y que se expresa como porcentaje molar guanina-citosina (G+C) y adenina-timina (A+T). Si dos bacterias tienen relaciones de bases muy diferentes (diferencia de contenido de G+C) en más del 10%, no se pueden considerar afines. Por el contrario, si la relación G+C entre dos bacterias es muy parecida o igual se consideran afines. Basado en la diferencia o afinidad de la relación G+C entre las bacterias se han creado nuevos géneros y cambiado bacterias de un género a otro. Los métodos de hibridación molecular relacionan la compatibilidad del ADN de un microorganismo con otro. En determinadas condiciones experimentales se separan las cadenas de ADN bicatenario en dos moléculas monocatenarias que se recombinan con las de otra bacteria en el caso de que sus secuencias de bases sea complementaria.

Más recientemente la aplicación de técnicas de biología molecular está permitiendo realizar una clasificación filogenética. Existen ciertas macromoléculas que pueden utilizarse para medir la distancia evolutiva. Una de estas macromoléculas es el ácido ribonucleico ribosómico (ARNr). En 1990 el progreso de estas técnicas de secuenciación y comparación del ARNr 16S en las procariotas y del ARNr 18S en las eucariotas, puso de manifiesto la presencia de una serie de nucleótidos modificados, lo que permitió proponer la creación de tres *Dominios o Imperios*:

Dominio o Imperio *Eucarya*: Agrupa a células eucarióticas. Los lípidos de la membrana celular están compuestos predominantemente por diésteres de glicerol y ácidos grasos. Los ribosomas contienen un tipo eucariótico de ARNr. Incluye a todos los organismos anteriormente clasificados en los reinos *Animalia, Plantae, Fungi y Protista*. Se ha sugerido su reclasificación en seis reinos: *Animalia, Plantae, Fungi, Flagelata, Ciliata y Microsporidia.*

Dominio o Imperio *Bacteria*: También denominadas eubacterias o bacterias verdaderas. Agrupa a células procarióticas. Los lípidos de la membrana celular están compuestos predominantemente por diacil-glicerol-diésteres. Los ribosomas contienen un tipo eubacteriano de ARNr.

Dominio o Imperio *Archaea*: Agrupa a células procarióticas primitivas. Los lípidos de la membrana celular están compuestos predominantemente por diésteres de glicerol e isoprenoides o diacil glicerol tetraésteres. Los ribosomas contienen un tipo arqueano de ARNr.

1.1 CLASIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS

La clasificación más utilizada actualmente, hasta que se consiga una basada en relaciones filogenéticas, es la recogida en el manual Bergey. En la novena edición del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1994) [213] se agrupan las bacterias en 35 grupos situados en 4 categorías mayores:

· **Eubacterias gramnegativas**. En esta categoría se incluyen la mayoría de las bacterias que son patógenas para el hombre. Comprende 16 grupos (1 a 16).
· **Eubacterias grampositivas**. En esta categoría están incluidas el resto de las bacterias que son patógenas para el hombre. Comprende 13 grupos (17 a 29).
· **Micoplasmas**. Incluye microorganismos que también producen infecciones en el hombre. Está formada por un solo grupo (30).
· **Arqueobacterias**. Estas bacterias no son patógenas para el hombre y viven en situaciones extremas (bacterias metanógenas, termófilas, halófilas, etc.). Incluye 5 grupos (31-35).

2. FAMILIA *ENTEROBACTERIACEAE*. CARACTERÍSTICAS GENERALES.

2.1 NOMENCLATURA Y CLASIFICACIÓN

La familia *Enterobacteriaceae* es el grupo más grande y heterogéneo de bacilos gramnegativos con importancia clínica. El presente estudio se ha circunscrito a determinados géneros de la familia *Enterobacteriaceae*; esta familia está clasificada, en el Bergey 9ª Ed., en el "Grupo 5: Bacilos gramnegativos anaerobios facultativos – Subgrupo 1: Familia *Enterobacteriaceae*" como se puede apreciar en la tabla 1 [214].

La nomenclatura y clasificación de la familia *Enterobacteriaceae* ha sido siempre complicada y confusa. Para poder diferenciar entre sí las diferentes cepas de una misma especie se recurre a marcadores específicos. Los marcadores que se han utilizado han sido: el biotipo, el serotipo, el lisotipo o fagotipo, el antibiotipo, el plasmotipo, el bacteriocinotipo y el DNAtipo.

En la actualidad se han descrito por lo menos 27 géneros y 102 especies, así como 8 grupos entéricos. Esos géneros han sido clasificados sobre la base de la homología del ADN, propiedades bioquímicas, reacciones serológicas, susceptibilidad a bacteriófagos específicos de género y de especie, y patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos.

La relación genética entre los géneros más comunes se ilustra en la figura 1.1 [214].

Tabla 1.- Familia *Enterobacteriaceae*

Género	Especie*
Arsenophonus	
Budvicia	
Buttiauxella	
Cedecea	
Citrobacter	*diversus* *freundii*
Edwardsiella	
Enterobacter	*cloacae*
Erwinia	
Escherichia	*coli*
Ewingella	
Hafnia	
Klebsiella	*pneumoniae*
Kluyvera	
Leclercia	
Leminorella	
Moellerella	
Morganella	
Obesumbacterium	
Pantoea	
Pragia	
Proteus	*vulgaris*
Providencia	
Rahnella	
Salmonella	*choleraesuis* **
Serratia	
Shigella	
Tatumella	
Xenorhabdus	
Yersinia	
Yokenella	

* Sólo se han especificado las especies que han sido objeto de este estudio.

(** serotipo enteritidis)

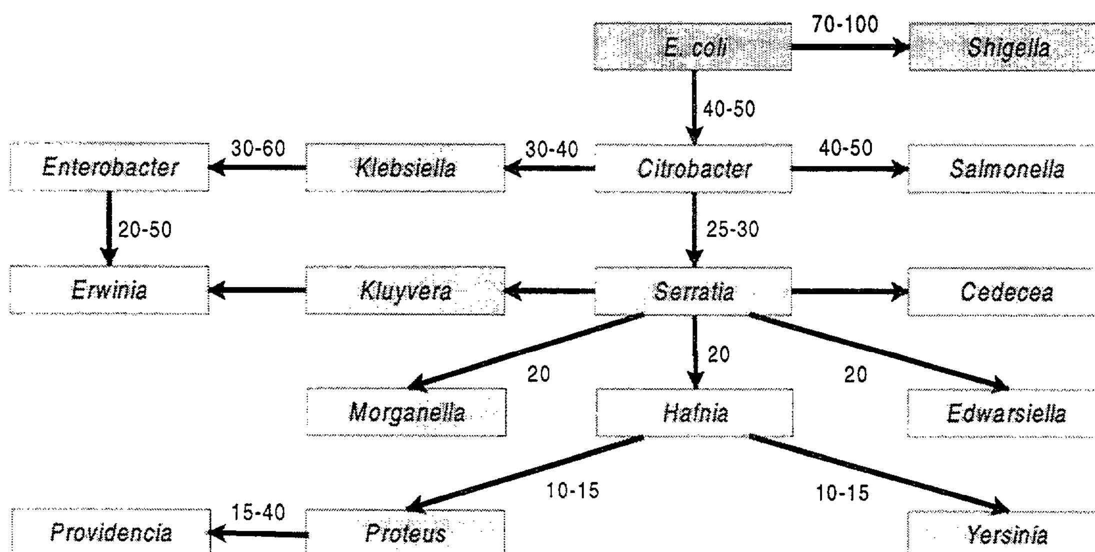


Figura 1.1: Relación genética entre los géneros más comunes de enterobacterias.

2.2 DESCRIPCIÓN DE LA FAMILIA

Los componentes de esta familia son bacilos gramnegativos de tamaño entre 0,3-1,0 × 1,0-6,0 μm, móviles por flagelos peritricos (excepto *Tatumella*) o inmóviles. Son gramnegativos, anaerobios facultativos y quimioorganotrofos. Tienen metabolismo tanto oxidante como fermentativo. Aunque la mayoría de las especies crecen bien a 37 °C, otras lo hacen mejor a 25-30 °C. No forman esporas y su relación de bases G+C contenidas en su ADN oscila entre el 39-59% [61, 214].

Las enterobacterias son organismos que se encuentran en ecosistemas tan variados como el suelo, el agua, las plantas, y formando parte de la flora intestinal normal de la mayoría de los animales, con inclusión de los humanos. La mayoría de las enterobacterias forman parte de la flora comensal normal del tubo digestivo y, auque inocuos, pueden causar infecciones oportunistas cuando hayan variado las condiciones del entorno. Sin embargo unos pocos miembros de esta familia deben considerarse como patógenos estrictos y poseen alto poder patógeno.

A pesar de la complejidad de esta familia, más del 95% de los aislamientos con importancia clínica pertenecen a menos de 25 especies.

Las enterobacteriáceas son responsables del 30 al 35% de todas las septicemias, más del 70% de todas las infecciones del tracto urinario y muchas infecciones intestinales. El 50% de todos los aislamientos con significancia clínica que se producen en los laboratorios de análisis se deben a esta familia [333]. Asimismo, junto con las pseudomonas y otros bacilos gramnegativos no fermentadores constituyen la causa más importante de las infecciones hospitalarias.

TABLA 2.- PRINCIPALES ESPECIES DE ENTEROBACTERIAS DE INTERÉS MÉDICO [392]		
Especies comensales más importantes (Oportunistas potenciales)	*Citrobacter diversus* *Citrobacter freundii* *Escherichia coli* *Hafnia alvei* *Klebsiella oxytoca* *Klebsiella pneumoniae* *Morganella morganii*	*Pantoea agglomerans* *Proteus mirabilis* *Proteus vulgaris* *Providencia alcalifaciens* *Providencia rettgeri* *Providencia stuartii* *Serratia marcescens*
Especies patógenas (Todas)	*Escherichia coli* *Klebsiella rhinoscleromatis* *Shigella boydii* *Shigella dysenteriae* *Shigella flexneri* *Shigella sonnei*	*Salmonella bongori* *Salmonella choleraesuis* *Yersinia enterocolitica* *Yersinia pestis* *Yersinia pseudotuberculosis*

2.3 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E IDENTIFICACIÓN

Las enterobacterias tienen las siguientes propiedades fundamentales:

- Crecen en aerobiosis y anaerobiosis (anaerobios facultativos).
- Fermentan la glucosa, con o sin producción de gas.
- Reducen los nitratos a nitritos.
- Producen catalasa.
- No producen oxidasa.
- Tienen requerimientos nutricionales simples.
- Crecen bien en medio de MacConkey.

En la tabla siguiente se muestran las principales reacciones bioquímicas de identificación de las principales especies de enterobacterias:

TABLA 3.- PRINCIPALES PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS ENTEROBACTERIAS

Especie	Indol	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons	Producción de SH_2	Ureasa	Fenilalanina desaminasa	Lisina descarboxilasa	Ornitina descarboxilasa	Movilidad	Gas en glucosa	Lactosa	Manitol	DNasa	Betagalactosidasa (ONPG)
Escherichia coli	+	+	–	–	–	–	–	+	±	+	+	+	+	–	+
Shigella spp.	±	+	–	–	–	–	–	–	±	–	–	–	+	–	±
Salmonella choleraesuis serotipo typhi	–	+	–	–	+	–	–	+	–	+	–	–	+	–	–
Salmonella choleraesuis serotipo paratyphi A	–	+	–	–	–	–	–	–	+	+	+	–	+	–	–
Salmonella choleraesuis otros serotipos	–	+	–	+	+	–	–	+	+	+	+	–	+	–	–
Citrobacter freundii	–	+	–	+	±	±	–	–	±	+	+	±	+	–	+
Citrobacter diversus	+	+	–	+	–	±	–	–	+	+	+	±	+	–	+
Klebsiella pneumoniae	–	–	+	+	–	+	–	+	–	–	+	+	+	–	+
Klebsiella oxytoca	+	±	+	+	–	+	–	+	–	–	+	+	+	–	+
Enterobacter aerogenes	–	–	+	+	–	–	–	+	+	+	+	+	+	–	+
Enterobacter cloacae	–	–	+	+	–	±	–	–	+	+	+	+	+	–	+
Hafnia alvei	–	±	±	–	–	–	–	+	+	±	+	–	+	–	+
Serratia marcescens	–	±	+	+	–	±	–	+	+	+	±	–	+	+	+
Proteus mirabilis	–	+	±	±	+	+	+	–	+	+	+	–	–	±	–
Proteus vulgaris	+	+	–	±	+	+	+	–	–	+	±	–	–	±	–
Providencia rettgeri	+	+	–	+	–	+	+	–	–	+	–	–	+	–	–
Providencia stuartii	+	+	–	+	–	±	+	–	–	±	–	–	–	–	–
Providencia alcalifaciens	+	+	–	+	–	–	+	–	–	+	±	–	–	–	–
Morganella morganii	+	+	–	–	–	+	+	–	+	+	+	–	–	–	–
Yersinia enterocolitica	±	+	–	–	–	±	–	–	+	–	–	–	+	–	+
Yersinia pseudotuberculosis	–	+	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	+	–	±
Yersinia pestis	–	±	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	±

+: 90% o más de reacciones positivas a la 48 horas de incubación.
–: 90% o más de reacciones negativas a la 48 horas de incubación.
±: diferentes porcentajes de reacciones positivas y negativas.

2.4 CARACTERÍSTICAS ANTIGÉNICAS

La clasificación serológica de la familia *Enterobacteriaceae* se basa en los antígenos bacterianos, que se detectan mediante aglutinación con antisueros específicos. Los tres tipos principales de antígenos son los lipopolisacáridos O somáticos, los antígenos K capsulares y las proteínas H flagelares:

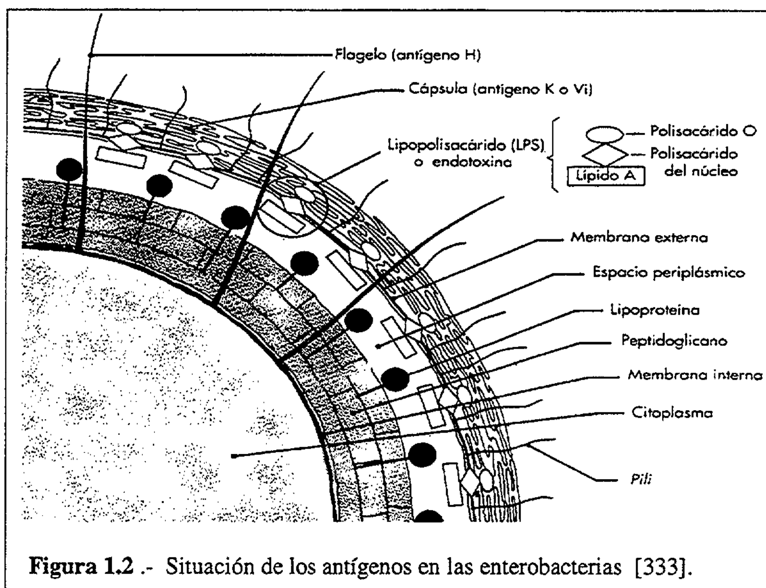


Figura 1.2 .- Situación de los antígenos en las enterobacterias [333].

Antígenos somáticos o antígenos O:

El principal antígeno de la pared celular está formado por el lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa. Este lipopolisacárido es termoestable y está formado por tres componentes:

- el polisacárido O antigénicamente variable.
- un polisacárido central común a todas las enterobacteriáceas (antígeno común) y compuesto por oligosacáridos y ácido ceto-desoxi-manulosoctónico (KDO) común a la mayoría de las bacterias gramnegativas, lo que explica la presencia de reacciones cruzadas.
- el lípido A al que se asocia la actividad como *endotoxina*, factor de virulencia compartido por todas las bacterias gramnegativas aerobias y algunas anaerobias. La toxicidad reside en este lípido A, componente del LPS, que es liberado cuando la célula muere y se produce su lisis. Muchas manifestaciones sistémicas de las infecciones gramnegativas se deben a la endotoxina.

Los antígenos O específicos existen en todos los géneros, aunque resultan comunes las reacciones cruzadas entre géneros íntimamente relacionados (p. ej.: *Salmonella* con *Citrobacter* y *Escherichia* con *Shigella*).

Antígenos capsulares o antígenos K:

Los antígenos K capsulares son proteínas o polisacáridos. En algunas enterobacterias constituyen una cápsula mientras que en otras forman una capa mucosa que recubre al antígeno O. Estos antígenos capsulares son responsables de la protección de la bacteria frente a la fagocitosis, puesto que los antígenos capsulares hidrofílicos repelen la superficie hidrofóbica de las células fagocíticas. Estos antígenos ocultan también a los de la pared celular y, por tanto, impiden en determinado grado la unión de los anticuerpos a la bacteria [333].

Antígenos flagelares o antígenos H:

Estos antígenos son proteínas que residen en los flagelos y que pueden experimentar variación antigénica o faltar de una célula en determinados momentos. Son termolábiles.

Antígenos de las fimbrias o antígenos F:

Son de naturaleza proteica, reside en las fimbrias o pili, son heterogéneos serológicamente y permiten clasificar las cepas en serotipos F.

2.5 FACTORES DE PATOGENICIDAD O VIRULENCIA

2.5.1 Producción de exotoxinas

En las enterobacterias se han identificado varias toxinas importantes; entre ellas se pueden incluir la enterotoxina termoestable, la enterotoxina termolábil, las enterotoxinas Shiga, las enterotoxinas similares a la Shiga y las hemolisinas.

Las enterotoxinas termolábiles, así como las toxinas Shiga y similares a la Shiga, consisten en una subunidad A y una o varias subunidades B (es decir, son del tipo A-B). La subunidad A es responsable de la actividad enzimática intracelular de la toxina, mientras que las subunidades B intervienen en la unión con la célula para facilitar la transferencia de la subunidad A a su interior.

La enterotoxina termolábil produce alteración del transporte de los electrólitos con la diarrea secretora consiguiente; es prácticamente idéntica a la toxina del cólera y es producida por *E. coli* y algunas cepas de *Klebsiella* y *Salmonella*.

La toxina termoestable es una proteína estable al calor. Esta toxina produce también una diarrea secretora y generalmente está presente en *E. coli*, y a veces en *Yersinia enterocolitica* y *Citrobacter freundii*.

La toxina *Shiga* es neurotóxica, enterotóxica y citotóxica para los animales. Esta toxina está producida por *Shigella dysenteriae*.

Las toxinas similares a la *Shiga* o verotoxinas producen un efecto citopático pronunciado y provocan toxicidad gastrointestinal. Estas toxinas están producidas por especies de *Shigella* y *E. coli*.

Las hemolisinas son toxinas que pueden producir destrucción celular como la lisis de los hematíes y de los leucocitos, y pueden estar sintetizadas por muchas especies.

2.5.2 Expresión de factores de adherencia

La adherencia de las bacterias a las células huéspedes está mediada por las fimbrias.

La mayoría de las enterobacteriáceas expresan fimbrias comunes tipo I, capaces de unirse a diversas células huéspedes.

El factor de colonización CEA/I y CFA/II de las fimbrias es un antígeno que se encuentra en muchas cepas de *E. coli* causantes de gastroenteritis.

El factor de adherencia P de las fimbrias, capaz de aglutinar los hematíes humanos que tienen el antígeno de grupo sanguíneo P, se encuentra en cepas uropatogénicas de *E. coli*.

El factor S de las fimbrias, que se une a los sialilgalactósidos en los hematíes humanos, es frecuente en las cepas de *E. coli* responsables de sepsis neonatal y meningitis [333].

2.5.3 Factores genéticos

Es frecuente observar en los miembros de esta familia la presencia de plásmidos, transposones y profagos que pueden codificar factores tanto de tipo estructural como metabólico, y que pueden intervenir, o no, tanto en su patogenicidad como en el sustrato utilizable o en la adquisición de resistencia a determinados agentes antimicrobianos.

2.5.4 Resistencia a los antimicrobianos

Los microorganismos son capaces de desarrollar resistencia a los antimicrobianos con la misma rapidez con que éstos se introducen en la terapéutica. El problema se agudiza cuando pensamos en la extensión de esa resistencia, puesto que puede estar codificada por plásmidos transferibles, lo que permite el intercambio de dicha resistencia entre especies, géneros e incluso familias bacterianas.

La terapia antimicrobiana debe ser establecida en función de los resultados obtenidos en las pruebas de susceptibilidad *in vitro*, la experiencia clínica y las características del paciente.

3. GÉNERO *ESCHERICHIA*. *ESCHERICHIA COLI*

3.1 CARACTERÍSTICAS Y EPIDEMIOLOGÍA

El género *Escherichia* consta de 5 especies, siendo *Escherichia coli* la aislada con más frecuencia. Las especies pertenecientes a este género son bastones rectos de 1,1-1,5 ×2,0-6,0 μm, que se encuentran tanto aislados como en parejas. Algunas cepas pueden presentar cápsula o microcápsula. Móviles por flagelos peritricos o inmóviles. Son gramnegativos, anaerobios facultativos y presentan un metabolismo tanto fermentativo como oxidativo.

Escherichia coli es un organismo quimioorganotrofo, oxidasa negativo y catalasa positivo, cuya temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C y cuyas colonias, aisladas en agar nutritivo, pueden ser tanto lisas como rugosas. Pueden usar el acetato como única fuente de carbono pero no el citrato; asimismo pueden fermentar la glucosa, y otros carbohidratos, con producción de piruvato, el cual es posteriormente convertido en los ácidos láctico, acético y fórmico. Parte de este ácido fórmico es transformado por medio de un sistema hidrogenoliasa en CO_2 y H_2. La mayoría de las cepas pueden fermentar la lactosa pero esta capacidad de fermentación de la lactosa puede estar latente o ausente. Reduce el nitrato y presenta reacción positiva con rojo de metilo, y negativa la prueba de Voges-Proskauer. Da negativa las pruebas de producción de SH_2, hidrólisis de la urea y la lipasa. Generalmente es citrato negativa. Para este género, la suma de bases G+C del ADN es del 48-52 moles% (T_m) [214].

La especie tipo es *Escherichia coli*. Esta bacteria es un comensal del tracto gastrointestinal siendo la enterobacteria más frecuentemente asociada con sepsis bacteriana, meningitis neonatal, infecciones del tracto urinario y gastroenteritis en viajeros a países con higiene deficiente. La mayoría de las infecciones (a excepción de la meningitis neonatal y la gastroenteritis) son endógenas (es decir, la flora microbiana normal del individuo es capaz de producir infección cuando las defensas del huésped están disminuidas) [333, 362].
La composición antigénica de *E. coli* es compleja y se han descrito gran número de antígenos O, H y K. La clasificación serológica de los aislados de *E. coli* tiene utilidad para fines epidemiológicos, y ciertos serotipos específicos se asocian con virulencia aumentada.

3.2 DETERMINANTES DE LA ACCIÓN PATÓGENA

- ANTÍGENOS

• El **antígeno O** es una estructura que forma parte del **lipopolisacárido** (LPS) de la membrana externa. Dependiendo de este LPS las cepas pueden adoptar forma lisa (S) o rugosa (R). Principal importancia adquiere la determinación del antígeno O basándose en la antigenicidad del LPS. En la actualidad se han definido 173 antígenos O [362].

• El **antígeno K** o antígeno capsular. Es debido al polisacárido de la cápsula, tiene propiedades aglutinantes y se han descrito 103 antígenos de este tipo.

Los antígenos O y K son responsables de virulencia en las cepas invasivas y presentan propiedades antifagocitarias e inhibidoras de las sustancias bactericidas del suero.

• El **antígeno H** o antígeno de los **flagelos**, de los cuales se han determinado 56 tipos diferentes.

• El **antígeno F**, fibrilar, de las fimbrias o pili que recubren la superficie de la mayoría de las bacterias. Se han descrito dos variedades principales de fimbrias basadas en su capacidad de hemaglutinación: Las fimbrias tipo 1 cuya hemaglutinación es inhibida por la manosa (manosa-sensibles o MS), y las que no lo son, o manosa-resistentes (MR). Las fimbrias tipo 1 (MS) se encuentran en la mayoría de las cepas de *E. coli* y se considera que facilitan la adherencia al moco de las diversas superficies mucosas y en particular a la mucosa urinaria. Las fimbrias MR tienen características adhesivas, funcionan como factores de virulencia y pueden ser especie-específicas u órgano-específicas.

- TOXINAS.

• Algunas cepas de *E. coli* producen **enterotoxinas**, debido a lo cual se denominan cepas de *E. coli* enterotoxigénicas (ECET). Dos de estas enterotoxinas han sido bien estudiadas, una es **termolábil** y otra es **termoestable**, ambas actúan aumentando la secreción de moco, agua y electrolitos a la luz intestinal.

• La toxina Shiga y otras toxinas relacionadas y denominadas toxinas tipo Shiga son denominadas verotoxinas debido a que causan un efecto citotóxico o citopático sobre las células de cultivos tisulares de la línea celular Vero [230].
Estas toxinas causan lesión de la mucosa intestinal, lo que da lugar al sangrado, pero sin producir reacción inflamatoria local.

- FERMENTOS.
•Algunas cepas producen **hemolisinas** cuya importancia patogénica es desconocida.

3.3 PATOLOGÍA. SÍNDROMES CLÍNICOS

3.3.1 GASTROENTERITIS

Las cepas de *E. coli* que causan gastroenteritis se pueden subdividir en cinco grupos: enterotoxigénicas enteroinvasivas, enteropatogénicas, enterohemorrágicas y enteroagregativas.

A.– ***E. coli* enterotoxigénico** (ECET) es el agente causal de diversas enfermedades como la "diarrea del viajero".

B.– ***E. coli* enteroinvasivo** (ECEI) causa una enteritis del intestino grueso dando lugar a unas diarreas similares a las producidas por *Shigella*.

C.– ***E. coli* enteropatogénico** (ECEP) es un agente importante como causante de los brotes epidémicos de diarreas infantiles de elevada mortalidad.

D.– ***E. coli* enterohemorrágico** (ECEH) se ha asociado a brotes de colitis hemorrágicas, situadas a nivel del intestino grueso.

E.– ***E. coli* enteroagregativo** (ECEAg) ha sido descrito como causa de una gastroenteritis localizada en el intestino delgado y que puede originar vómitos, deshidratación, diarrea persistente, con heces a veces teñidas de sangre, y fiebre ligera [333, 392].

3.3.2 INFECCIONES DEL TRACTO URINARIO

E. coli es el agente más frecuente de las infecciones urinarias, siendo el responsable de más del 80% de todas las infecciones del tracto urinario (ITU) adquiridas en la comunidad, y de la mayoría de las adquiridas en el hospital. Ello es debido a que es el microorganismo más frecuente en el tubo digestivo y en el periné, desde donde invade el tracto urinario por vía ascendente, causando generalmente una infección oportunista. Las ITU

son catorce veces más frecuentes en las mujeres que en los hombres, debido a la longitud de la uretra, más corta en aquéllas. La enfermedad se asocia con un limitado número de serotipos específicos O:K:H, denominados uropatógenos, sobre todo los serogrupos O4, O6 y O75. Estos serotipos poseen adhesina del tipo MR, como los *pili* P y S, que son frecuentemente hemolíticas [333, 392].

3.3.3 MENINGITIS NEONATAL

E. coli, junto con los estreptococos grupo B, representan la causa más común de meningitis neonatal; el 75% de las cepas causales poseen el antígeno capsular KI. Aunque es común la colonización de los lactantes por *E. coli* en el momento del parto, la enfermedad resulta relativamente poco frecuente.

3.3.4 SEPTICEMIA

E. coli es el bacilo gramnegativo aislado con más frecuencia en pacientes con procesos generalizados, bacteriemias y sepsis. El foco de infección desde el que los microorganismos se diseminan al torrente sanguíneo se localiza habitualmente en el tracto urinario o en el gastrointestinal. La mortalidad por septicemia debida a *E. coli* depende de la fuente de infección y la enfermedad subyacente del paciente, y es significativamente más alta en los enfermos inmunodeprimidos o con infecciones debidas a perforación intestinal.

3.3.5 OTRAS INFECCIONES

También es agente en infecciones biliares, peritoneales, de heridas y mucosas. Las infecciones extraintestinales ocurren cuando hay circunstancias predisponentes como obstrucción y estasis de vías urinarias y biliares, disminución de los mecanismos defensivos, etc.

TABLA 4.- SEROGRUPOS DE *E. COLI* RELACIONADOS CON DIVERSAS PATOLOGÍAS [392].

	Serogrupos principales	**Serogrupos secundarios**
E. coli enteropatógenas	26 · 55 · 86 · 111 · 119 · 125 · 126 · 127 · 128ab	18 · 44 · 114 · 142 · 158
E. coli enterotóxicas	6 · 7 · 8 · 15 · 25 · 27 · 63 · 75 · 78 · 148 · 153 · 159	1 · 9 · 20 · 60 · 75 · 80 · 85 · 88 · 89 · 90 · 101 · 109 · 114 · 115 · 128ac · 139 · 167
E. coli enterohemorrágicas	26 · 157	1 · 91 · 111 · 113 · 117 · 121 · 145
E. coli enteroinvasiva	112ac · 124	28ac · 29 · 42 · 136 · 143 · 144 · 152 · 164 · 167
E. coli enteroagregativa	77	7 · 86 · 126 · 127
E. coli uropatógenas	2 · 6	1 · 4 · 7 · 8 · 9 · 11 · 22 · 25 · 62 · 75

4. GÉNERO *ENTEROBACTER*.

4.1 MORFOLOGÍA Y CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS

Se presentan con morfología de bastones rectos de 0,6 a 1,0 μm de ancho por 1,2 a 3,0 μm de longitud. Son gramnegativos, móviles por flagelos peritricos (excepto *Enterobacter asburiae*), anaerobios facultativos, quimioorganotrofos, con metabolismo tanto oxidativo como fermentativo. Su temperatura óptima de crecimiento oscila entre 30 y 37 °C.
La glucosa y otros glúcidos son metabolizados con producción de ácidos y gas. Son indol negativos. Muchas cepas (el 100% de *Enterobacter cloacae*) son Voges-Proskauer y citrato de Simmons positivos. Son lisina negativos (excepto *Enterobacter gergoviae*) y ornitina positivos (excepto *E. agglomerans*), mientras que la reacción del rojo de metilo es variable. Muchas cepas utilizan el malonato y licuan la gelatina lentamente (3 a 14 días).
Las especies que pertenecen a este género no producen SH_2, desoxirribonucleasa ni lipasa [214].

4.2 EPIDEMIOLOGÍA

Es un género ampliamente distribuido en la naturaleza y cuyas especies pueden encontrarse en agua, suelo y plantas; así como en heces y aguas residuales.

4.3 PATOLOGÍA

Este género consta de muchas especies, siendo *Enterobacter cloacae* la especie tipo. Las especies más importantes son *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter sakasakii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter agglomerans* y *Enterobacter gergoviae*, las cuales son patógenos oportunistas que pueden causar infecciones en quemaduras, heridas, tracto urinario y provocar ocasionalmente meningitis y septicemias.
E. cloacae y *E. aerogenes* son dos especies frecuentemente aisladas en casos clínicos, y que son causa de infecciones nosocomiales.
E. agglomerans se ha aislado de vez en cuando de algunas muestras clínicas, y es realmente un grupo heterogéneo de organismos compuesto de una docena de subgrupos.
E. agglomerans comparte con *E. sakazakii* la pigmentación amarillenta característica de sus colonias y la tendencia a causar meningitis neonatal y sepsis.
Las otras especies de *Enterobacter* pueden ser difíciles de identificar porque son bioquímicamente similares entre sí y producen pocas infecciones en humanos si exceptuamos a *Enterobacter taylorae*. Entre estas otras especies podemos citar a *Enterobacter cancerogenus* [435], *Enterobacter intermedius*, *Enterobacter dissolvens* y *Enterobacter nimipressuralis* que se han aislado de muestras clínicas de procedencia humana.

TABLA 5.- PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE DIFERENCIACIÓN DE LA ESPECIE *ENTEROBACTER CLOACAE* [214]

Rojo de metilo	–	**Producción de ácidos a partir de:**	
Voges-Proskauer	+	D-Adonitol	⊖
Hidrólisis de la urea	v	Dulcitol	⊖
Lisina-descarboxilasa	–	Glicerol	v
Arginina-dihidrolasa	+	*mio*-Inositol	⊖
Ornitina-descarboxilasa	+	Melobiosa	+
Movilidad	+	α-metil-D-Glucósido	⊕
Hidrólisis de la gelatina a 22 °C	–	Rafinosa	+
Crecimiento en CNK	+	L-Ramnosa	+
Uso del malonato	⊕	D-Sorbitol	+
Pigmento amarillo a 25 °C	–	Sacarosa	+

+ : 90 a 100% de cepas positivas. – : 90 a 100% de cepas negativas.
⊕ : 80 a 90% de cepas positivas. ⊖ : 80 a 90% de cepas negativas.
v : porcentajes variables de positividad y negatividad dependiendo de la cepa.

TABLA 6.- **PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE DIFERENCIACIÓN ENTRE LAS DIFERENTES ESPECIES DEL GÉNERO *ENTEROBACTER*** [406]

Especie	Suma G + C del ADN (Mol %)	Cepa tipo
E. aerogenes	53-54	ATCC 13048
E. agglomerans	53-58	ATCC 27155
E. amnigenus Biogrupo 1	60	ATCC 33072
E. amnigenus Biogrupo 2		
E. asburiae		
E. cloacae	52-54	ATCC 13047
E. dissolvens	60-80	ATCC 23373
E. gergoviae	60	ATCC 33028
E. hormaechei		
E. intermedius		CIP 79-27
E. nimipressuralis	55-65	ATCC 9912
E. sakazakii	57	ATCC 29544
E. taylorae		ATCC

TABLA 7.- PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE DIFERENCIACIÓN ENTRE EL GÉNERO *ENTEROBACTER* Y OTROS GÉNEROS RELACIONADOS [214, 406]

Características	***Enterobacter***	***Klebsiella***	***Hafnia***	***Serratia***
Movilidad	+[a]	–	⊕	+
Ornitina descarboxilasa	+[b]	–	+	+[c]
Arginina deshidrolasa	v	–	–	–[d]
Desoxirribonucleasa	–	–	–	+
Hidrólisis de la Gelatina	–	v	–	⊕
Citrato	+	+[e]	–	+
Sensibilidad a fagos de *Hafnia*	–	–	+	–
Utilización del D-Sorbitol	–	+	–	⊕

+ : 90 a 100% de cepas positivas. – : 90 a 100% de cepas negativas.
⊕ : 75 a 89% de cepas positivas. ⊖ : 75 a 89% de cepas negativas.
v : porcentajes variables de positividad y negatividad dependiendo de la cepa.

[a] *Enterobacter asburiae* y casi la mitad de las cepas de *Enterobacter hormaechei* son inmóviles.
[b] *Enterobacter agglomerans* es negativo.
[c] *Serratia odorifera* biogrupo 2, *Serratia plymuthica* y *Serratia rubidaea* son negativas.
[d] *Serratia grimesii* es positiva.
[e] *Klebsiella pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* y algunas cepas de *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae* son negativas.

5. GÉNERO *CITROBACTER*.

5.1 MORFOLOGÍA

Los componentes de este género se presentan como bastones rectos de 1 μm de diámetro y de 2,0 a 6,0 μm de longitud aproximadamente. Aparecen solos o en parejas, generalmente no encapsulados, y móviles por flagelos peritricos, gramnegativos y anaerobios facultativos.

5.2 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS

Son quimioorganotrofos y tienen un metabolismo tanto oxidante como fermentativo. Crecen fácilmente en medios ordinarios, presentando en agar nutritivo unas colonias de aproximadamente 2 a 4 mm de diámetro, lisas, ligeramente convexas, húmedas, translúcidas u opacas y grises, con una superficie satinada y un borde uniforme. Ocasionalmente pueden generarse formas mucosas y rugosas. Su temperatura óptima de crecimiento es 37 °C. Son oxidasa negativos y catalasa positivos. Pueden utilizar el citrato como única fuente de carbono. Reducen los nitratos a nitritos pero no descarboxilan la lisina y no producen fenilalanina desaminasa, gelatinasa, lipasa ni desoxirribonucleasa. Fermentan la glucosa con producción de ácido y gas. La prueba de Voges-Proskauer es negativa, y la prueba del rojo de metilo da positiva.
La mayoría de las cepas de *C. freundii* pueden crecer en medios líquidos de enriquecimiento como el caldo selenito y el caldo tetrationato así como en medios selectivos de aislamiento como el agar SS, el agar con desoxicolato y citrato, y el agar con verde brillante o con sulfito de bismuto.

Aunque, en general, las cepas de *C. diversus* y *C. amalonaticus* puedan crecer en los medios antes mencionados, muchas de ellas serán inhibidas en mayor o menor grado; por lo tanto deberán elegirse otros medios menos selectivos como el agar de MacConkey o el agar con desoxicolato, lisina y xilosa.

El porcentaje de bases G+C de este género es de 50-52 moles % (Tm).
La especie tipo es *Citrobacter freundii*. Las otras dos especies importantes de este género son *C. diversus* y *C. amalonaticus*.

5.3 EPIDEMIOLOGÍA

Se ha encontrado en heces humanas normales y de otros animales por lo que probablemente es un comensal del intestino humano, aunque también se ha encontrado en muestras clínicas produciendo infecciones, por lo que se le considera un patógeno oportunista. Asimismo se ha encontrado en muestras de suelo, agua, alimentos y aguas negras. En las muestras clínicas, no sólo se ha encontrado en heces, sino también en orina, esputos y sangre; en meningitis, otitis, faringitis, heridas y abscesos.

C. freundii es generalmente susceptible a los aminoglucósidos, cloranfenicol y colistina. La susceptibilidad frente a ampicilina, tetraciclinas y cefalosporinas varía dependiendo de la cepa. *C. diversus* y *C. amalonaticus* son sensibles a los aminoglucósidos, cefalosporinas, colistina, cloranfenicol y tetraciclinas; pero parecen ser resistentes a la ampicilina y carbenicilina.

TABLA 8.- PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE DIFERENCIACIÓN ENTRE LAS DIFERENTES ESPECIES DEL GÉNERO *CITROBACTER* [419]

Características	***C. freundii***	***C. diversus***	***C. amalonaticus***
Producción de Indol	−	+	+
Producción de SH_2	+	−	−
Arginina dihidrolasa	v	+	+
Ornitina descarboxilasa	v	+	+
Crecimiento en CNK	+	−	+
Uso del malonato	−	+	−
Hidrólisis de la esculina	−	v	+
Producción de ácidos a partir de:			
D-Adonitol	−	+	−
Salicina	−	+	+
Lactosa	v	+	+
Sacarosa	v	−	−
Suma G + C del ADN (Mol %)	50 - 51	51 - 52	51 - 52
Cepa tipo	ATCC 8090	ATCC 27156	ATCC 25405

+ : 90 a 100% de cepas positivas. − : 90 a 100% de cepas negativas.
v : porcentajes variables de positividad y negatividad dependiendo de la cepa.

TABLA 9.- PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE DIFERENCIACIÓN ENTRE EL GÉNERO *CITROBACTER* Y OTROS GÉNEROS BIOQUÍMICAMENTE SIMILARES [419]

Características	***Citrobacter***	***Salmonella***	***Escherichia***	***Enterobacter***
Lisina-descarboxilasa	–	+	+	v
Citrato de Simmons	+	+	–	+
Voges - Proskauer	–	–	–	+
Crecimiento en CNK	v[a]	–	–	+
Producción de indol	v[b]	–	+	–
Ornitina descarboxilasa	v[c]	+	+	+
Hidrólisis de ONPG	+	v	+	+
Suma G + C del ADN (Mol %)	50 - 52	50 - 53	48 - 52	52 - 59

+ : 90 a 100% de cepas positivas. – : 90 a 100% de cepas negativas.
v : porcentajes variables de positividad y negatividad dependiendo de la especie.

a : Sólo *C. diversus* es negativo.
b : Sólo *C. freundii* es negativo.
c : Sólo menos del 20% de *C. freundii* son negativos.

6. GÉNERO *KLEBSIELLA*.

6.1 MORFOLOGÍA Y BIOQUÍMICA

Las especies de este género se presentan como bastones rectos de 0,3 a 1,0 µm de diámetro y de 0,6 a 6,0 µm de longitud aproximadamente. Aparecen solos, en parejas o en cortas cadenas. Encapsulados, inmóviles, gramnegativos y anaerobios facultativos. Son quimioorganotrofos y tienen un metabolismo tanto oxidante como fermentativo. No requieren factores especiales de crecimiento. Muchas cepas pueden utilizar la glucosa o el citrato como única fuente de carbono. Su temperatura óptima de crecimiento es 37 °C. Son oxidasa negativos y catalasa positivos. Usualmente descarboxilan la lisina pero no la ornitina. No producen arginina-dihidrolasa, pero muchas especies hidrolizan la urea. Crecen en medios con CNK, no producen SH_2 y muchas especies fermentan casi todos los carbohidratos de prueba excepto el dulcitol y el eritritol. La glucosa y otros carbohidratos son metabolizados con producción de ácidos y gas. Reducen los nitratos a nitritos. Las reacciones del indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer y citrato de Simmons varían de una especie a otra [214].
El porcentaje de bases G+C de este género es de 53-58 moles % (Tm).
La especie tipo es *Klebsiella pneumoniae*. Este microorganismo es una causa importante de infecciones nosocomiales y adquiridas en la comunidad.

6.2 PATOLOGÍA

Los componentes de este género pueden encontrarse en muestras clínicas, así como en el suelo, agua, semillas, frutas y vegetales. *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*, y ocasionalmente otras especies del género, son patógenos oportunistas que pueden causar bacteriemia, neumonía, infecciones del tracto urinario y otras infecciones.
En los últimos años ha habido un aumento de infecciones por *Klebsiella*, particularmente en hospitales, debido a cepas multirresistentes. Se considera que el tracto gastrointestinal es el reservorio principal y las manos del personal sanitario el principal vehículo de transmisión. Estas infecciones ocurren particularmente en pacientes urológicos, neonatos y en las unidades de cuidados intensivos. Asimismo se han descrito cepas de *Klebsiella* productoras de enterotoxina y puede causar también infecciones de heridas y tejidos blandos [363].
La especie aislada con más frecuencia es *Klebsiella pneumoniae*, una causa de neumonía lobular primaria adquirida en la comunidad. Los alcohólicos y los pacientes con compromiso de la función pulmonar experimentan riesgo aumentado de neumonía, en particular por *Klebsiella*, debido a que son incapaces de eliminar las secreciones orales aspiradas hasta el tracto respiratorio bajo. La neumonía por *Klebsiella* cursa frecuentemente con destrucción necrótica de los espacios alveolares, formación de cavidades y expectoración manchada de sangre.

6.3 DIFERENCIACIÓN BIOQUÍMICA, ANTÍGENOS Y BIOTIPOS

Los miembros de este género tienen una cápsula prominente de polisacáridos, responsable del aspecto mucoide de las colonias aisladas y de la mayor virulencia de los gérmenes *in vivo*. Esta característica la distingue de otras enterobacterias, excepto de algunas cepas de *Enterobacter aerogenes* y de *Escherichia coli*. El mayor problema es poder

distinguir entre *Klebsiella pneumoniae* y cepas inmóviles de *Enterobacter aerogenes* que licuan la gelatina muy lentamente. La prueba de la ureasa puede ser decisiva en estos casos ya que *Klebsiella pneumoniae* es ureasa positiva en tanto que *Enterobacter aerogenes* es ureasa negativo [214].

Debido a dicha cápsula existen más de 80 antígenos capsulares (AgK) que pueden ser utilizados para serotipar las diferentes especies del género *Klebsiella*.

Klebsiella oxytoca es bioquímicamente similar a *K. pneumoniae* salvo porque es indol positiva y comparte también con *K. pneumoniae* la tendencia a producir cápsulas que se manifiestan como colonias mucosas cuando han crecido en medios ricos en carbohidratos.

Un alto porcentaje de cepas de muestras clínicas, y particularmente aquéllas pertenecientes a infecciones nosocomiales, contienen el factor R que determina su resistencia a una amplia variedad de fármacos como β-lactámicos, cefalosporinas, aminoglucósidos, tetraciclinas, cloranfenicol, sulfamidas y trimetoprim. Todas la cepas de *Klebsiella* son resistentes a la ampicilina y esta resistencia puede residir en los genes del cromosoma o ser mediada por genes residentes en el cromosoma y en un plásmido. Las bacterias del género *Klebsiella* son generalmente buenos receptores para los factores R, un hecho que las puede convertir en agentes de enfermedades epidémicas nosocomiales graves.

Estas bacterias poseen tanto el antígeno O (lipopolisacárido, LPS) como el antígeno K (polisacárido), pero el tipado serológico está basado en el examen de los antígenos K. Esto es debido a que el número de tipos del antígeno O es menor que el de antígenos K, y porque la determinación del antígeno O es obstaculizada por los antígenos K termoestables [214, 363].

En la octava edición del Manual Bergey (1974) [66] se describieron tres especies en el género *Klebsiella*: *K. pneumoniae*, *K. ozaenae* y *K. rhinoscleromatis*. Posteriormente *K. ozaenae* y *K. rhinoscleromatis* fueron considerados como subespecie de *K. pneumoniae* en la primera edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Vol 1, 1984)* [262], debido a que los estudios de recombinación del ADN habían demostrado que estas tres especies pertenecían al mismo grupo afín de ADN [58, 59, 60]. Tres subespecies de *K. pneumoniae* se han propuesto: *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*, y *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* [363]. La descripción de cada una de las tres subespecies se corresponde con la de las especies anteriores.

Otra especie propuesta de *Klebsiella* es *Klebsiella terrigena*, un nombre para cepas que se derivan principalmente de los entornos acuáticos y terrenos. También se ha propuesto, como nueva especie de *Klebsiella*, *Klebsiella planticola*, constituida por cepas que se aislaron principalmente de entornos forestales y del suelo [38, 159, 160, 198, 235].

En la edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology,* (Vol 1, 1984) el género *Klebsiella* se restringe a cepas inmóviles, pero se ha propuesto transferir *Enterobacter aerogenes* al género *Klebsiella* como *Klebsiella mobilis* [38, 159, 160, 198, 235]. *E. aerogenes* está bioquímicamente y genéticamente tanto o más relacionado con *Klebsiella* que con la mayoría de las otras especies de *Enterobacter* [38, 59, 60, 159, 160, 198, 235].

TABLA 10.- PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE DIFERENCIACIÓN ENTRE LAS DIFERENTES SUBESPECIES DE LA ESPECIE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* [214]

Características	subespecie *ozaenae*	subespecie *pneumoniae*	subespecie *rhinoscleromatis*
Producción de indol	–	–	–
Rojo de metilo	+	⊖	+
Voges - Proskauer	–	+	–
Citrato de Simmons	v	+	–
Hidrólisis de la urea	–	+	–
Lisina-descarboxilasa	v	+	–
Utilización del malonato	–	+	+
Producción de ácido a partir de:			
dulcitol	–	v	–
β-gentibiosa	+	+	–
lactosa	v	+	–
D-melocitosa	–	–	–
mucato	⊖	+	–
Utilización del gentisato	–	–	–
Utilización del m-hidroxibenzoato	–	–	–
Crecimiento a 10 °C	–	–	–
Gas de lactosa a 44 °C	+	+	+
Hidrólisis del pectato	–	–	–
Cepa tipo	ATCC 11296	ATCC 13883	ATCC 13884
Suma G + C del ADN (Mol %) (*Tm*)	56 - 58		

+ : 90 a 100% de cepas positivas. – : 90 a 100% de cepas negativas.
⊕ : 75 a 89% de cepas positivas. ⊖ : 75 a 89% de cepas negativas.
v : porcentajes variables de positividad y negatividad dependiendo de la cepa.

TABLA 11.- PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE DIFERENCIACIÓN ENTRE LAS ESPECIES DE *KLEBSIELLA* Y *ENTEROBACTER* [214]

Especie \ Características		Producción de Indol	Rojo de Metilo	Hidrólisis de la Urea	Lisina descarboxilasa	Arginina dihidrolasa	Ornitina	Movilidad	Crecimiento en CNK	Utiliza el Malonato	Gas de D-Glucosa	Ácido de D-Adonitol	Ácido de *mio*-Inositol	Ácido de Melobiosa
K. oxytoca		+	⊖	+	+	−	−	−	+	+	+	+	+	+
K. planticola		⊖	+	+	+	−	−	−	+	+	+	+	+	+
K. pneumoniae	subsp. *ozaenae*	−	+	−	v	−	−	−	⊕	−	v	+	v	+
	subsp. *pneumoniae*	−	⊖	+	+	−	−	−	+	+	+	+	+	+
	subsp. *rhinoscleromatis*	−	+	−	−	−	−	−	⊕	+	−	+	+	+
K. terrigena		−	v	−	+	−	⊖	−	+	+	⊕	+	⊕	+
E. aerogenes		−	−	−	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+
E. agglomerans		⊖	v	⊖	−	−	−	⊕	v	v	⊖	−	⊖	v
E. amnigenus		−	⊕	−	−	v	⊕	+	+	+	+	−	−	+
E. asburiae		−	+	v	−	⊖	+	−	+	−	+	−	−	−
E. cloacae		−	−	v	−	+	+	+	+	⊕	+	⊖	⊖	+
E. dissolvens		−	−	+	−	+	+	+	+	+	+	−	v	+
E. gergoviae		−	−	+	+	−	+	+	−	+	+	−	−	+
E. hormaechei		−	v	⊕	−	⊕	+	v	+	+	⊕	−	−	−
E. intermedius		−	+	−	−	−	+	+	v	+	+	−	−	+
E. minipressuralis		−	−	−	−	+	+	+	+	+	+	−	−	+
E. sakazakii		⊖	−	−	−	+	+	+	+	⊖	+	−	⊕	+
E. taylorae		−	−	−	−	+	+	+	+	+	+	−	−	−

\+ : 90 a 100% de cepas positivas. − : 90 a 100% de cepas negativas.
⊕ : 75 a 89% de cepas positivas. ⊖ : 75 a 89% de cepas negativas.
v : porcentajes variables de positividad y negatividad dependiendo de la cepa.

TABLA 12.- PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE DIFERENCIACIÓN ENTRE EL GÉNERO *KLEBSIELLA* Y OTROS GÉNEROS RELACIONADOS [214, 406]

Características	*Enterobacter*	*Klebsiella*	*Hafnia*	*Serratia*
Movilidad	+[a]	–	⊕	+
Ornitina descarboxilasa	+[b]	–	+	+[c]
Arginina deshidrolasa	v	–	–	–[d]
Desoxirribonucleasa	–	–	–	+
Hidrólisis de la Gelatina	–	v	–	⊕
Citrato	+	+[e]	–	+
Sensibilidad a fagos de *Hafnia*	–	–	+	–
Utilización del D-Sorbitol	–	+	–	⊕

+ : 90 a 100% de cepas positivas. – : 90 a 100% de cepas negativas.
⊕ : 75 a 89% de cepas positivas. ⊖ : 75 a 89% de cepas negativas.
v : porcentajes variables de positividad y negatividad dependiendo de la cepa.

[a] *E. asburiae* y casi la mitad de las cepas de *E. hormaechei* son inmóviles.
[b] *E. agglomerans* es negativo.
[c] *S. odorifera* biogrupo 2, *S. plymuthica* y *S. rubidaea* son negativas.
[d] *S. grimesii* es positiva.
[e] *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* y algunas cepas de *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* son negativas.

7. GÉNERO *PROTEUS*.

7.1 MORFOLOGÍA Y FISIOLOGÍA

Las especies de este género se presentan como bastones rectos de 0,4-0,8 µm de diámetro por 1-3 µm de longitud, gramnegativos y móviles por flagelos peritricos. La mayoría de las cepas se propagan con ciclos periódicos de migración que producen zonas concéntricas, o se extienden en una película uniforme, sobre las superficies húmedas de los medios de cultivo de agar o gelatina. Esta expansión de las colonias como en oleadas (ciclos periódicos de migración y consolidación) producen anillos concéntricos en la placa alrededor del punto de inoculación. Este fenómeno de colonización en oleadas de *Proteus* dificulta su aislamiento de las bacterias de otras especies contenidas en los especímenes patológicos cultivados en medios con agar y, por consiguiente, se han ideado métodos para prevenir la extensión de dicho fenómeno en las placas de cultivo, como incorporar sales biliares o detergentes, o reducir la concentración de cloruro sódico o aumentar la de agar. La incorporación de 0,1-0,3 mM de p-nitrofenil-glicerol en medios de cultivo sólidos también inhibe el fenómeno de oleada sin afectar a la formación de flagelos ni a la motilidad y, debido a su baja toxicidad para *Proteus* y otras bacterias, se está estudiando una aprobación de su uso en el laboratorio clínico. Los organismos de este género se ajustan a la definición de la familia *Enterobacteriaceae*. Son anaerobios facultativos y quimioorganotrofos, teniendo un tipo de metabolismo tanto respiratorio como fermentativo [214].

El porcentaje de bases G + C del ADN es de 38-41 mol% (T_m)

Especie tipo: *Proteus vulgaris*.

7.2 PRUEBAS BIOQUÍMICAS

La temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C. La D-glucosa y otros hidratos de carbono son catabolizados con producción de ácido y normalmente gas. Oxidasa negativos, catalasa positivos, y rojo de metilo positivo. Hidrolizan la urea y producen SH_2. Las especies varían en las pruebas de indol, Voges Proskauer y citrato de Simmons. La lisina-descarboxilasa y la arginina-dihidrolasa son negativas (sólo *Proteus mirabilis* descarboxila la ornitina). La fenilalanina y el triptófano son desaminados oxidativamente; esta prueba es muy utilizada para diferenciar *Proteus*, *Providencia* y *Morganella* de otras enterobacterias [214].

Descompone la tirosina para producir un aclaramiento en medios de agar en el que el aminoácido insoluble se ha incorporado. Crecen en CNK, no utilizan el malonato, reducen los nitratos a nitritos y producen ácido de varios mono- y disacáridos. Una o más especies fermentan el glicerol, la maltosa, la sacarosa, la trehalosa y la D-xilosa; pero no producen ácidos a partir del inositol ni de los tetra-, penta- o hexahidroxialcoholes de cadena lineal [374].

7.3 SEROTIPOS Y ANTIGENICIDAD

El serotipado de *Proteus vulgaris* y *Proteus mirabilis* puede lograrse a partir de 49 antígenos somáticos O, antígenos que usan el esquema simplificado de Kauffmann y Perch (1966). Este esquema incluye cepas de ambas especies para preparar el antisuero O. Diecisiete de los antígenos O están presentes en cepas de *P. vulgaris*, 27 en cepas de *P. mira-*

bilis, y 5 se encuentran en cepas de ambas especies. Tres antígenos O, designados A, B y C, y otros 11 designados 100-104 y 200-205, han sido definidos en otros estudios pero no han sido incluidos sistemáticamente en el método extendido de Kauffmann-Perch. Los aislados se aglutinan generalmente en antisuero contra las cepas de las mismas especies y, por consiguiente, la separación de las serovariedades para facilitar esquemas individuales para cada especie facilita el serotipado. Las cepas frecuentemente aisladas son *P. mirabilis* con antígenos O de los tipos 3, 6 ó 10 [374].

El número de antígenos flagelares (H) según el esquema de Kauffmann-Perch son 19. Los antígenos H más comunes son los tipos 1, 2 y 3. Las reacciones cruzadas entre los antígenos H son numerosas y complejas. El uso de los antígenos H para diferenciar las cepas de *Proteus* ha estado limitado esencialmente a los estudios iniciales de Kauffmann y Perch de 1948.

Se ha demostrado la existencia del antígeno capsular K en algunas cepas de *P. vulgaris* y *P. mirabilis*. No se ha estudiado la estructura antigénica de *P. myxofaciens* [374].

7.4 RESISTENCIAS INTRÍNSECAS

Los *P. vulgaris* y *P. mirabilis* presentan una resistencia intrínseca a la bacitracina, polimixina y colistina pero son generalmente susceptibles al ácido nalidíxico. Ambas especies presentan cepas tanto resistentes como susceptibles a la nitrofurantoína y a las tetraciclinas pero la proporción de cepas resistentes frente a esta última está en aumento. La mayoría de *P. mirabilis* y más de la mitad de las cepas de *P. vulgaris* es susceptible al cloranfenicol. Las cepas de *P. mirabilis* son generalmente susceptibles a las penicilinas y cefalosporinas mientras que las cepas de *P. vulgaris* son generalmente resistentes. La mayoría de las cepas de ambas especies son susceptibles a los aminoglucósidos. Ambas especies pueden adquirir plásmidos que codifican resistencias frente a antimicrobianos que dan lugar a un marcado aumento en la resistencia a los aminoglucósidos y/o a otros antimicrobianos a los que estas especies son generalmente susceptibles. La susceptibilidad frente a los antimicrobianos de *P. myxofaciens* no se ha estudiado [374].

7.5 EPIDEMIOLOGÍA Y SÍNDROMES CLÍNICOS

Las cepas de *Proteus* están extensamente distribuidas en la naturaleza. Podemos encontrar bacterias de *P. mirabilis* y *P. vulgaris* en el estiércol, el suelo y las aguas contaminadas, donde se piensa que tienen una función importante en la descomposición de los materiales orgánicos. La más común de las dos especies es *P. mirabilis*. Ambas especies se pueden encontrar en el intestino de una amplia variedad de animales y en una gran parte de la población humana. *P. myxofaciens* no se ha aislado en humanos [214].

P. mirabilis y *P. vulgaris* pueden causar infecciones primarias y secundarias en el hombre. La infección del tracto urinario por *Proteus vulgaris*, y sobre todo por *Proteus mirabilis*, es la enfermedad más frecuente producida por miembros del género, aunque también pueden ocasionar otras infecciones extraintestinales. Un factor mencionado a menudo y que contribuye a la patogenicidad de estos microorganismos en el tracto urinario es la actividad de la ureasa, ya que las cepas de *Proteus* producen grandes cantidades de esta enzima, que es capaz de descomponer la urea en $C0_2$ y NH_3. Eso eleva el pH de la orina y facilita la formación de cálculos renales por precipitación de sales. La mayor alcalinidad de la orina resulta perjudicial también para el uroepitelio. A pesar de la diversidad serológica de estos microorganismos, la infección no ha sido relacionada con ningún serotipo específico. Además, en contraste con *E. coli*, la presencia de *pili*

puede disminuir de hecho la virulencia de *Proteus* al facilitar la fagocitosis de los bacilos [333].

Las infecciones por *Proteus* del tracto urinario ocurren con más frecuencia en pacientes hospitalizados, quienes son más susceptibles a la infección debido a ciertas condiciones predisponibles como la cateterización, la cirugía o la instrumentación urológica del tracto urinario. Aproximadamente un cuarto de la población son portadores intestinales de *Proteus*, de forma que el paciente puede infectarse con su propia flora, aunque también puede contraer la infección mediante la transmisión de las bacterias de otros pacientes o a partir de un reservorio común.

Estas infecciones del tracto urinario también pueden dar lugar a bacteriemias que son difíciles de tratar y a menudo pueden ser fatales.

Los bacilos del género *Proteus*, bajo condiciones adecuadas, pueden ser invasores oportunistas y causar lesiones sépticas en otros lugares del cuerpo, habiéndose aislado de las infecciones de heridas, quemaduras, tracto respiratorio, ojos, oídos y garganta [374].

7.6 TAXONOMÍA

La clasificación del género *Proteus* ha cambiado desde la 8ª edición del manual de Bergey en el que se indicaba que este género estaba compuesto de cinco especies: *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *P. rettgeri*, *P. morganii* y *P. inconstans*. El *P. myxofaciens*, por otro lado, se excluyó del género *Proteus* porque se pensaba que esta especie era la misma que *Erwinia herbicola* (hoy *Enterobacter agglomerans*). La prueba más convincente para los mayores cambios en la clasificación se derivó de los estudios del ácido desoxirribonucleico (ADN) [58, 61]. Se aceptaron dos especies de *Providencia*: especies de *Proteus* que estaban previamente en el subgrupo bioquímico A se trasladaron a *Providencia alcalifaciens* y aquellos que se encontraban en el subgrupo B a *Providencia stuartii*. Se encontró que *Proteus rettgeri* estaba más estrechamente relacionado con las últimas dos especies que con *Proteus vulgaris* o *P. mirabilis* y, por consiguiente, se le asignó al género *Providencia*. *Proteus morganii* se encontró que no estaba más relacionado con *Proteus* y *Providencia* que con cualquier otra enterobacteria y se trasladó al género *Morganella*, el género propuesto anteriormente por Fulton en 1943. *Proteus myxofaciens* fue incluido en el género *Proteus* debido a su similitud fenotípica y a su relación de hibridación de ADN/ADN con *P. vulgaris* y *P. mirabilis*. Su ADN está sólo un 10% relacionado con el ADN de una cepa de *Erwinia herbicola* [374].

Proteus vulgaris

Las características generales son las descritas para el género, aunque se describen otras características más adelante en las tablas que siguen. Algunas cepas son hemolíticas en agar sangre, se encuentra en muestras clínicas con menos frecuencia que el *P. mirabilis* y generalmente son resistentes a las penicilinas y cefalosporinas.

El porcentaje de bases G+C del ADN es de 39,3 ± 1,2 mol% (T_m) (Falkow et al., 1962).
Cepa tipo: ATCC 13315.

TABLA 13.- PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE DIFERENCIACIÓN BIOQUÍMICA DE LA ESPECIE *PROTEUS VULGARIS* [214].

Característica				
Producción de Indol	+		**Producción de ácidos a partir de:**	
Voges - Proskauer	–		D-Adonitol	–
Citrato de Simmons	⊖		D-Arabitol	–
Producción de SH_2	+		Glicerol	v
Hidrólisis de la urea	+		*mio*-Inositol	–
Ornitina descarboxilasa	–		Maltosa	+
Hidrólisis de la gelatina	+		D-Manosa	–
Gas de la D-Glucosa	⊕		α- metil-D-Glucósido	v
Desoxirribonucleasa	⊕		L-Ramnosa	–
Lipasa	⊕		Sacarosa	+
Aclaramiento de Tirosina	+		Trealosa	v
Efecto oleada	+		D-Xilosa	+

\+ : 90 a 100% de cepas positivas. – : 90 a 100% de cepas negativas.
⊕ : 75 a 89% de cepas positivas. ⊖ : 75 a 89% de cepas negativas.
v : porcentajes variables de positividad y negatividad dependiendo de la cepa.

8. GÉNERO *SALMONELLA*.

8.1 MORFOLOGÍA Y FISIOLOGÍA

Los miembros de este género son bastones cortos y anchos de 0,5 a 0,8 µm de grueso y 1,0 a 3,5 µm de longitud. Pueden ser móviles por flagelos peritricos o inmóviles, no esporulados. Son gramnegativos, aerobios o anaerobios facultativos, crecen bien en medios ordinarios, a un pH de 6 a 8 y a temperaturas entre 15 y 41 °C, aunque su temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C. Crecen bien en medios normales, pero las salmonelas, y las shigelas, presentan mayor resistencia que las otras enterobacterias a las sales biliares como el desoxicolato sódico y otros compuestos químicos como el verde brillante; del mismo modo pueden utilizar mejor el tetrationato y el selenito sódicos como fuente de energía.

8.1.1 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS

La salmonelas producen ácido y gas (menos *S. typhi*), por fermentación, partiendo de glucosa, dextrosa, maltosa, manitol, dextrina y trehalosa. No fermenta ni sacarosa ni lactosa. No crece en malonato pero sí descarboxila la lisina. Producen SH_2 (menos *S. paratyphi* A), y no producen indol [333].

8.1.2 CARACTERÍSTICAS ANTIGÉNICAS

La clasificación taxonómica del género *Salmonella* siempre ha planteado problemas y han llegado a describirse más de 1.500 serotipos distintos de *Salmonella*. Este género, y su precursor *Arizona*, están tan estrechamente relacionados en las líneas evolutivas y en el grado de homología del ADN que se han considerado un solo género, el género *Salmonella*.
Salmonella typhi y *Salmonella typhimurium* han sido recientemente incluidas en la subdivisión gamma de la clase *Proteobacteria* mediante el análisis de la secuencia del RNA ribosómico 16S [82].

El análisis minucioso de la homología del ADN revela que el género consiste en una sola especie que se ha subdividido en siete subgrupos. Aunque se ha recomendado la designación de una sola especie (*Salmonella*

TABLA 15.– IDENTIFICACIÓN DE *SALMONELLA*, *SHIGELLA* Y *YERSINIA* [391].

	Glucosa	Gas	Lactosa	β-galac.	SH_2	LDC	Indol	Urea
S. enteritidis	+	+	–	–	+	+	–	–
S. typhi	+	–	–	–	+d	+	–	–
Shigella	+	–	–	v	–	–	v	–
Y. enterocolitica	+	–	–	+	–	–	v	+
Y. pestis	+	–	–	–	–	–	–	–

β-galac. = β-galactosidasa LDC = Lisina-descarboxilasa v = variable d = débil

enterica), la mayoría de los autores siguen usando el método convencional, que designa el epíteto de serotipo como nombre de especie.
En la novena edición del Manual Bergey [214] aparece el género *Salmonella* constituido por dos especies, *S. bongori* y *S. choleraesuis*; esta última dividida en seis subespecies. La mayoría de las cepas (>99%) aisladas en los laboratorios clínicos pertenecen a *Salmonella choleraesuis* (subgrupo 1), subespecie *choleraesuis* [214].

Los miembros de cada uno de los siete subgrupos de *Salmonella* pueden ser serotipados de acuerdo a los antígenos siguientes:

- Antígeno somático O
- Antígeno capsular de superficie Vi
- Antígeno flagelar de Fase 1
- Antígeno flagelar de Fase 2

La descripción antigénica detallada de cada serotipo se presenta en una notación en donde los grandes grupos antigénicos están separados por dos puntos O:Vi:F1:F2 [179, 214, 333].

8.2 SÍNDROMES CLÍNICOS

Las infecciones por *Salmonella* pueden manifestarse en cuatro formas: enteritis, bacteriemia, fiebre entérica y colonización asintomática. En los casos graves también pueden producir daño fatal respiratorio, esplénico, hepático y neurológico, así como bacteriemia, meningitis, infección respiratoria y cardíaca, osteomielitis y otras infecciones locales.
S. typhi produce una enfermedad febril, conocida como fiebre tifoidea.
S. paratyphi A, *S. schottmuelleri* (llamado antes *S. paratyphi B)* y *S. hirschfeldii* (conocido antes como *S. paratyphi C)* producen una forma leve de la enfermedad denominada fiebre paratífica.
Salmonella choleraesuis causa gastroenteritis y fiebre entérica, especialmente en niños y *Salmonella typhimurium* es otro de los serotipos aislados con más frecuencia [179, 333, 391].

8.3 EPIDEMIOLOGÍA

El reservorio de las salmonelas gastroentéricas se encuentra en el tubo digestivo de prácticamente todos los animales como roedores, reptiles, gallinas y otras aves, vacas, y todos los animales domésticos en general, así como en humanos.
El reservorio animal se mantiene por contacto entre animales y por el empleo de piensos contaminados con *Salmonella* y es importante para salmonelas que causan enteritis. Las salmonelas tifo-paratíficas se eliminan por heces desde el intestino y la vesícula biliar donde se multiplican.
Tras la desaparición de la enfermedad, el foco biliar permanece eliminando microorganismos hasta pasados 2 ó 3 meses y, en ciertos casos como personas con cálculos biliares, pueden estar eliminando bacterias durante toda su vida. Estos portadores crónicos constituyen el reservorio más importante de la enfermedad.
Ciertos serotipos, como *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi* A, B y C, están muy adaptados al hombre, teniéndolo como reservorio exclusivo, y no causan enfermedad en otros huéspedes. Sin embargo, algunas cepas de *Salmonella* están adaptadas a los animales, pero cuando infectan a los humanos pueden causar enfermedad grave (p. ej., *Salmonella choleraesuis)*. Por último, muchas cepas no muestran especificidad de huésped y causan enfermedad tanto en el hombre como en otros animales.

La mayoría de las infecciones se deben a ingestión de agua o productos alimentarios contaminados, o a contagio fecal-oral en los niños.
Aunque la exposición a *Salmonella* es frecuente, resulta necesario un inóculo grande

(10^{5-7} bacterias) para el desarrollo de enfermedad sintomática. La enfermedad se produce cuando el microorganismo tiene oportunidad de multiplicarse hasta alcanzar una concentración alta como, por ejemplo, en alimentos mal refrigerados. La dosis infecciosa necesaria es menor en individuos con factores de riesgo como edad, disminución de la acidez gástrica, inmunodepresión o procesos subyacentes (leucemia, linfoma, etc.).

Las salmonelas pueden sobrevivir meses en cultivos húmedos y a temperaturas bajo cero, y durante semanas en aguas de bebida y en aguas fecales. Sin embargo muere si se mantiene una hora a 56 °C o más, y por cloración de las aguas y pasteurización [179, 333, 391].

2 La Pared Celular Bacteriana.

Introducción.

Componentes de la pared celular en bacterias gramnegativas.

1 - Peptidoglicano.

2 - Periplasma.

3 - Membrana externa.

3.A) El Lipopolisacárido (LPS).

- Mecanismo de acción del LPS como endotoxina

3.B) Las Proteínas.

- Porinas.
- Proteínas de canales específicos.
- La proteína de membrana externa OmpA.

3.C) La importancia como barrera de la membrana externa.

- El efecto de la carga iónica, hidrofobicidad y campo eléctrico.
- Resistencia debida a la baja permeabilidad de la membrana.
- Mecanismos internos de resistencia.
- Incidencia clínica y nuevas estrategias para superar la barrera de la membrana externa.

Introducción

La pared celular es una estructura múltiple y compleja, semirrígida, que consta de varios estratos, situada externamente a la membrana citoplásmica y que constituye el exoesqueleto de la bacteria. Esta estructura, de unos 30 nm de espesor, es responsable tanto de la forma de la bacteria como de su protección interna frente a factores adversos como la presión osmótica. Esta función mecánica es vital, ya que en un ambiente hipotónico dicha presión po-

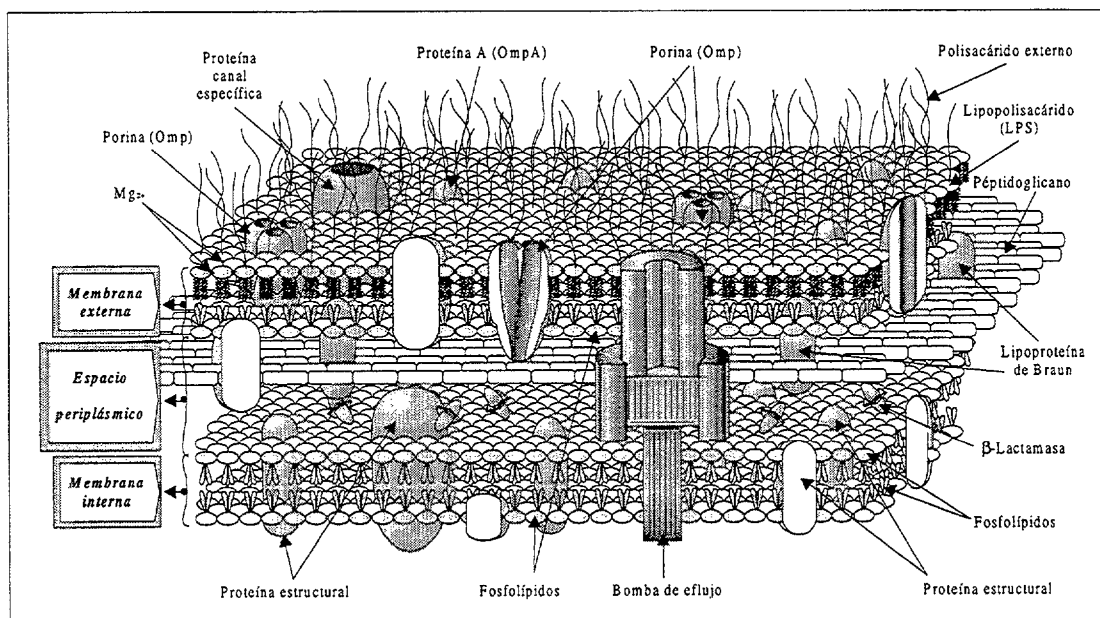


Figura 2.1.- Pared celular de las bacterias gramnegativas

dría provocar la ruptura de la membrana celular, y la lisis osmótica, al ser la presión intracelular generalmente varias veces mayor que la extracelular, sobre todo en las bacterias grampositivas. También se ha observado que actúa como filtro, impidiendo la entrada de macromoléculas pero no el paso de agua y metabolitos esenciales, y parece intervenir en el movimiento y en la división celular [150, 151, 443].

Determinados componentes de la pared celular bacteriana se comportan como potentes antígenos, tiene importancia como factor de adherencia a superficies epiteliales y sobre ella van a actuar ciertos antimicrobianos así como los bacteriófagos.

La pared celular bacteriana también es muy importante como factor taxonómico ya que, mediante la tinción diferencial de Gram, las bacterias pueden diferenciarse en dos grandes grupos: grampositivas y gramnegativas.

Aunque tanto las bacterias grampositivas como gramnegativas poseen pared celular, la estructura de ambas paredes es muy distinta. La pared de una bacteria grampositiva consta esencialmente de una sola capa de peptidoglicano de 30 a 200 moléculas de espesor y que supone del 40 al 80 % del peso seco de la pared; no contienen lípidos ni proteínas, contienen ácidos teicoicos que funcionan como antígenos de superficie y externamente puede o no existir una cápsula o capa de limo.

La pared de una bacteria gramnegativa está compuesta por dos capas fácilmente distinguibles pero mucho más finas que la pared de una bacteria grampositiva. La más exterior es la membrana externa, que es una estructura bilaminar exclusiva de los procariotas gramnegativos y que está compuesta de lipopolisacáridos, fosfolípidos y proteínas. La segunda capa está situada internamente a la membrana externa y está compuesta de un fino estrato monomolecular de peptidoglicano que equivale sólo al 5 ó 10 % del peso seco de la pared. El área entre la superficie interna de la membrana externa y la superficie externa de la membrana citoplásmica se conoce como espacio periplásmico, que es donde se encuentran una amplia variedad de enzimas y proteínas muy importantes para el metabolismo bacteriano [150].

COMPONENTES DE LA PARED CELULAR EN BACTERIAS GRAMNEGATIVAS

1 - PEPTIDOGLICANO

El componente de la pared celular también llamado peptidoglicano, glucopéptido, mureína, mucopéptido o mucocomplejo de Park, es un heteropolímero de azúcares y aminoácidos sintetizados únicamente por las células procariotas. Los peptidoglicanos presentan variaciones en su composición química y estructura, de unas especies a otras, pero existen similitudes básicas entre todos ellos. De hecho, se conocen en la actualidad más de 100 quimiotipos diferentes de peptidoglicano. Desde el punto de vista químico el peptidoglicano es un heteropolímero regular compuesto de moléculas alternativas de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y de su éster láctico, el ácido N-acetilmurámico (MurNAc) ó 3-o-lactilglucosamina, unidos entre sí mediante enlaces glucosídicos β-1,4 y formando cadenas lineales de 10 a 65 unidades de disacárido (GlcNAc-MurNAc). Al mismo tiempo, las moléculas de MurNAc, a través del grupo lactilo y mediante enlaces peptídicos, se hallan unidas a péptidos cortos compuestos de 4 a 5 aminoácidos, que varían poco en su constitución, y que pertenecen en su mayoría al isómero conformacional D que habitualmente no se encuentra en ningún otro tipo de sustancia natural. Los aminoácidos integrantes de este péptido son generalmente la L-alanina, el ácido D-glutámico, el DAP

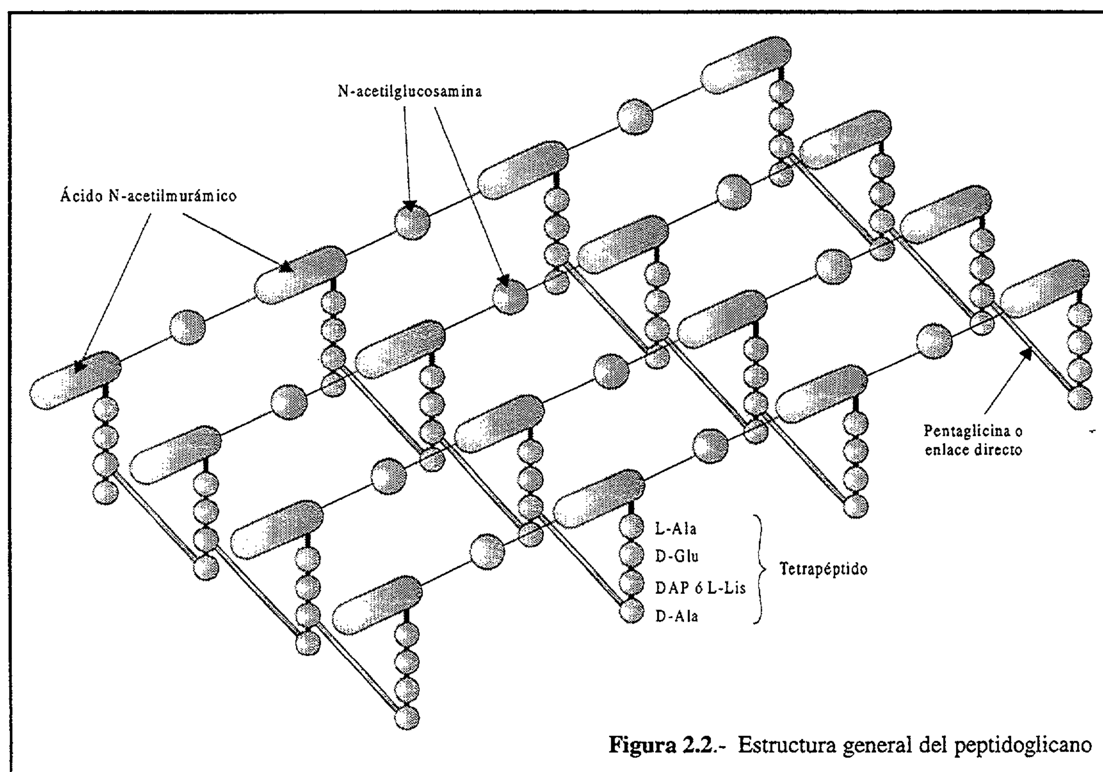


Figura 2.2.- Estructura general del peptidoglicano

(ácido *meso*-diaminopimélico ó 2,6-diaminopimélico, en los gramnegativos) o la L-lisina (en los grampositivos) y la D-alanina. El DAP o la L-lisina de una cadena peptídica pueden formar enlaces peptídicos con la D-alanina de otra de las cadenas peptídicas perteneciente a otra cadena lineal de peptidoglicano, uniendo entre sí las cadenas lineales del heteropolímero. Muchas de estas cadenas peptídicas están entrecruzadas unas con otras confiriendo una gran rigidez a la estructura, siendo el grado y tipo de entrecruzamiento típico de cada especie. En las bacterias gramnegativas las cadenas peptídicas están interconectadas directamente entre sí mediante un puente entre el grupo carboxílico terminal de una cadena (D-Ala) y el grupo amino del DAP de la otra. En cambio, en las bacterias grampositivas, las cadenas peptídicas están interconectadas a través de otro corto péptido, quien generalmente es un pentapéptido de glicina, que forma un puente entre el grupo carboxílico terminal de una cadena (D-Ala) y el grupo amino de la L-lisina de la otra. [151, 443].

La localización del peptidoglicano en este tipo de pared fue determinada por primera vez en *Escherichia coli*, comprobando que el peptidoglicano constituye la capa más interna de la pared, pudiendo aislarse como una bolsa delgada que mantiene la forma y el contorno de la célula original, una vez que los demás componentes de la pared han sido separados con tratamientos adecuados. El peptidoglicano de las bacterias gramnegativas tiene un bajo grado de entrecruzamiento entre las cadenas de glicano y muchas de las cadenas peptídicas no se entrecruzan [333, 443].

En las paredes celulares grampositivas, el peptidoglicano puede tener entre 30 a 200 moléculas de espesor, lo que supone del 40 al 80% del total del peso seco de la pared. Sin embargo, el peptidoglicano de la mayoría de las paredes de las bacterias gramnegativas está constituido por una capa monomolecular o como máximo bimolecular, constituyendo tan sólo del 5 al 10% del total del peso seco de la pared bacteriana [150, 333, 443].

La capa de peptidoglicano de la pared lleva una pequeña lipoproteína específica de peso molecular 7,2 kDa, llamada **lipoproteína del peptidoglicano**, o lipoproteína de Braun, que forma un puente de anclaje para la membrana externa. La región C-terminal de esta proteína es un resto de lisina que está unida mediante un enlace peptídico al tetrapéptido de la molécula del peptidoglicano, y más concretamente al grupo amino libre de la molécula de un ácido *m*-diaminopimélico que no esté implicado en entrecruzamientos en la capa de peptidoglicano.
En el otro extremo de la proteína, en la región N-terminal, hay un resto de cisteína al que se unen tres ácidos grasos: uno se une al grupo amino terminal mediante un enlace de tipo amida y los otros dos esterifican un resto de glicerol que está unido al grupo sulfhidrilo de la cisteína mediante un enlace tipo tioéter. Este extremo de la proteína, compuesta de las cadenas hidrófobas de los tres ácidos grasos, se inserta en la cara más interna de la membrana externa, anclando, por consiguiente, la capa de peptidoglicano a la membrana externa [349, 443].
Esta lipoproteína es muy abundante, existiendo $7x10^5$ moléculas por célula, de las que aproximadamente un tercio están unidas al peptidoglicano [349]. A pesar de su abundancia y de su clara función estructural, la lipoproteína del peptidoglicano no es aparentemente esencial para la supervivencia ya que se han aislado cepas mutantes que crecen bien careciendo de esta proteína [443].

2 - PERIPLASMA

El periplasma o espacio periplásmico es un espacio, inexistente en las bacterias grampositivas, que está situado entre la membrana citoplásmica y la membrana externa de las bacterias gramnegativas y ha sido identificado por estudios ultraestructurales y bioquímicos [150].
El espesor total del espacio periplásmico oscila entre 30 y 70 nm y se estima que puede constituir un 20-40% del volumen celular total [349].
El espacio periplásmico se encuentra lleno de un fluido, probablemente un gel, en el que se encuentra inmersa la capa o red móvil de peptidoglicano.
En el periplasma se encuentran muchas enzimas como las β-lactamasas, proteasas y nucleasas, así como un gran número de proteínas que participan en la adquisición y transporte, al interior de la célula, de nutrientes y materiales implicados en diversos procesos metabólicos del microorganismo [150, 393, 443].

3 - MEMBRANA EXTERNA

La membrana externa es una bicapa lipídica asimétrica cuya hoja interna está constituida de fosfolípidos y su hoja externa de lipopolisacáridos, entre otros constituyentes. Se encuentra recubriendo a la delgada capa de peptidoglicano de las bacterias gramnegativas, es exclusiva de los procariotas gramnegativos y funciona como un filtro molecular que regula el paso de moléculas mayores de 700 daltons hacia la célula. Tiene un espesor de 6 a 10 nm, dependiendo de la especie, y, al igual que la membrana celular, está formada por una **bicapa lipídica** que contiene fosfolípidos y proteínas, pero difiere de cualquier otra membrana biológica en la composición de lípidos y en el número de proteínas. La hoja más interna de la membrana está compuesta de fosfolípidos de forma similar a la membrana citoplásmica, a la que se une en ocasiones mediante invaginaciones conocidas como uniones de Bayer [150]. Sin embargo, la hoja externa está compuesta casi en su totalidad de una molécula que posee una parte hidrofóbica y otra hidrofílica, es decir, anfipática: el **lipopolisacárido** (LPS) [349, 443]. Esta sustancia, debido a su toxicidad, fue denominada originalmente **endotoxina** y se encuentra siempre en el exterior de la célula pues, excepto durante su formación, nunca pasa al interior celular.
Las **proteínas** de la membrana externa de las bacterias gramnegativas se encuentran en poca variedad, pero las que podemos encontrar se hallan en gran número [191], lo que origina una cantidad total en peso mayor que la que se puede encontrar en la membrana citoplásmica.
Algunas de estas proteínas atraviesan de parte a parte toda la membrana externa, por lo que se denominan **proteínas transmembrana**. A este grupo pertenecen una variedad de proteínas, conocidas como **porinas** que tienen la particularidad de formar agregados de tres moléculas atravesadas por un poro o canal, lo cual hace que pongan en comunicación el espacio extracelular con el espacio periplásmico, permitiendo la difusión de moléculas hidrofílicas menores de 700 Da a través de la

membrana. Las moléculas de mayor tamaño difunden a través de **proteínas de canal específico** que constituyen sistemas de transporte específicos para estos compuestos. Otro tipo de proteínas transmembrana son las **proteínas integrales** que parece que están implicadas en el mantenimiento de la estructura de las membranas y la pared. Las **proteínas periféricas**, o de superficie, cuyo principal cometido es actuar de diana para determinadas sustancias o elementos como los fagos [191].
En esta membrana también podemos encontrarnos con una **lipoproteína**, denominada lipoproteína de Braun, insertada en esta membrana y que la une con la capa del peptidoglicano, dándole rigidez al conjunto [150, 333].

La membrana externa tiene una gran importancia para las bacterias gramnegativas, puesto que presenta una superficie externa con fuerte carga negativa, lo que es importante para evitar la fagocitosis y la acción del complemento. Asimismo proporciona una barrera de permeabilidad que incrementa la resistencia a los agentes tóxicos; entre estos se encuentran elementos de defensa del huésped como la lisozima, la betalisina y la proteína leucocitaria, muy tóxicos frente a bacterias grampositivas, que carecen de la membrana externa. Esta membrana también protege de algunas sustancias presentes en el tracto digestivo, como las sales biliares y las enzimas digestivas, así como a una amplia gama de antimicrobianos [151, 443].
La doble composición polisacárida/hidrofílica y lipídica/hidrofóbica de la membrana externa le permite excluir tanto a sustancias hidrofílicas como hidrofóbicas; ello podría ocasionar un gran problema de aporte de nutrientes para la bacteria ya que gran parte de las sustancias no podrían atravesarla. Para obviar parte de este inconveniente, las bacterias gramnegativas incluyen en su membrana externa ciertas proteínas transmembrana denominadas porinas, a través de las cuales pueden difundir pequeñas moléculas hidrofílicas [150, 191, 333].

3.A) EL LIPOPOLISACÁRIDO (LPS)

Los LPS son moléculas complejas, situadas en la hoja externa de la membrana externa de casi todas las bacterias gramnegativas. La mayor parte de los trabajos sobre la estructura de los LPS han sido realizados sobre los LPS presentes en la membrana externa del género *Salmonella* [410]. Los LPS tienen unos pesos moleculares superiores a 10 kDa, varían en su composición química e intervienen en la configuración de la membrana externa de forma análoga a los fosfolípidos en la formación de la membrana citoplásmica, es decir, insertando el extremo hidrófobo de su molécula en el lado hidrófobo de la membrana externa y situando su extremo hidrófilo de forma que se proyecte en el medio externo [333].
La molécula anfipática del LPS se compone de tres regiones distintas: el lípido A (hidrofóbico), la región polisacárida central R (core) y la cadena lateral O, antígeno O o polisacárido específico O (hidrofílico) [151].

El lípido A es la región hidrófoba del LPS, actúa como anclaje en la membrana y ocupa el lugar de los fosfolípidos en la hoja exterior de la bicapa de la membrana. Está formado por un disacárido fosforilado de la glucosamina cuyos grupos hidroxilo han sido esterificados, en su mayoría, por 3-hidroxiácidos grasos, característicos de la molécula, y cuyos grupos β-hidroxilos son, a su vez,

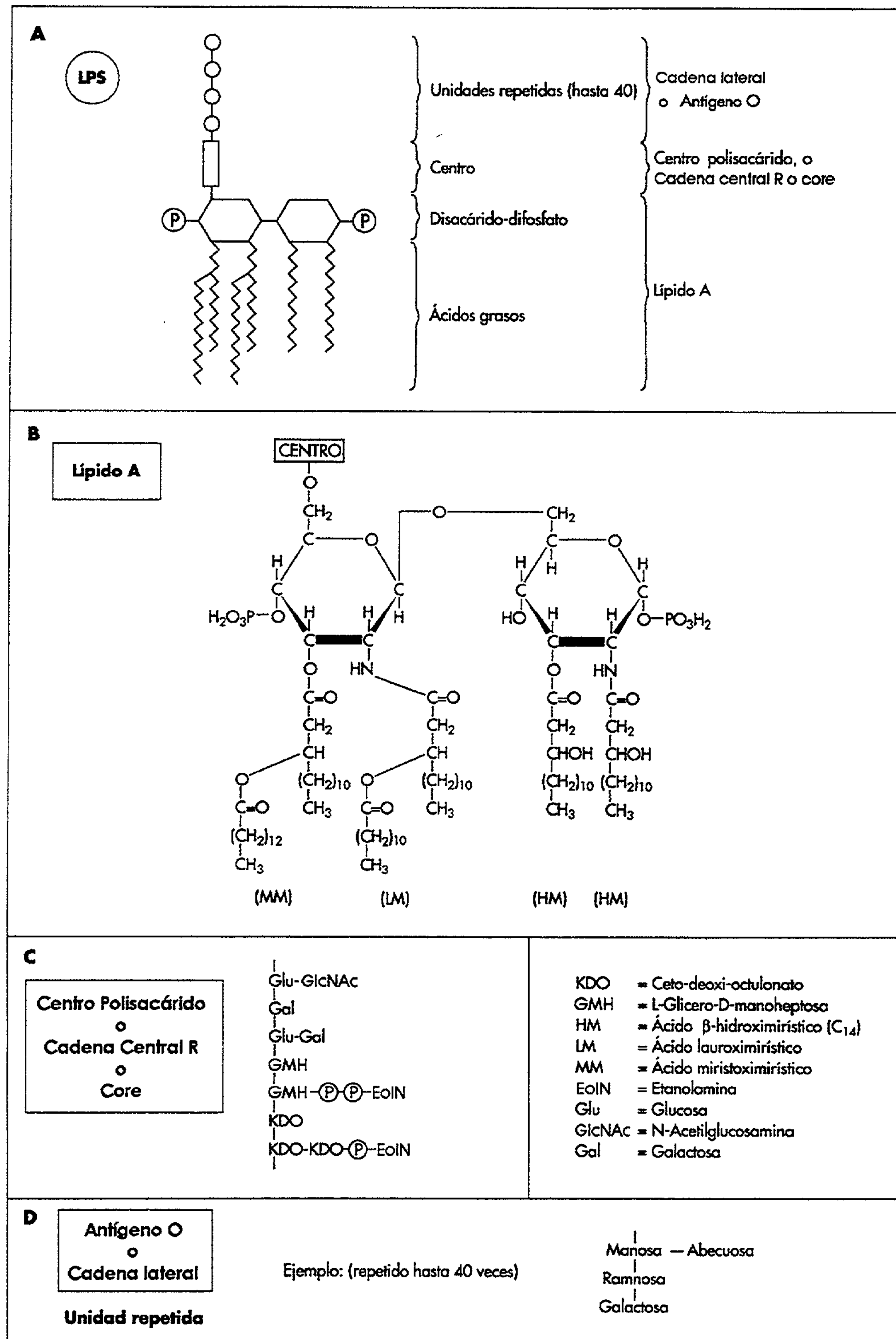


Figura 2.3.- Lipopolisacárido (LPS) de la célula gramnegativa. **A**, estructura general del polímero que muestra la disposición de los componentes principales. **B**, estructura del lípido A de *Salmonella typhimurium*. **C**, centro polisacárido o cadena central R o core. **D**, unidad repetida típica de *Salmonella typhimurium*: cadena lateral o antígeno O.

esterificados por otros ácidos grasos (no β-hidroxílicos), originando la estructura característica 3-acil-oxi-acil.

Por tanto, el lípido A:

- Tiene seis o siete ácidos grasos en vez de los dos típicos de un fosfolípido.
- Todos los ácidos grasos presentes en el lípido A son saturados, a diferencia de los presentes en los fosfolípidos. Algunos de estos ácidos grasos se unen directamente al dímero de glucosamina y otros lo hacen esterificando a los 3-hidroxiácidos grasos.
- Es poco antigénico pero se identifica como la endotoxina, por lo que es el responsable de la toxicidad y el cuadro de choque séptico que puede aparecer en las toxiinfecciones causadas por las bacterias gramnegativas.

La región central R de oligosacárido tiene una composición bastante estable entre las diferentes especies y está compuesta por una corta cadena de azúcares, dos de los cuales son poco frecuentes: el ácido 2-ceto-3-desoxioctónico (KDO), exclusivo del LPS, y una heptosa. Esta región central R queda unida a la posición 6 de un resto de glucosamina del lípido A.

La cadena lateral hidrófila O, también compuesta por azúcares, queda unida a su vez a la región central R y se extiende en dirección distal hacia el exterior de la célula, quedando inmersa en el medio extracelular. Está formada por múltiples unidades repetidas de tetra o pentasacáridos, variando el número, composición y secuencia de estos azúcares según la especie bacteriana, y es la responsable de la especificidad del antígeno O. Constituye la zona más externa de la bacteria y le confiere a la superficie bacteriana un carácter hidrofílico que impide la penetración de compuestos hidrofóbicos, entre ellos compuestos lesivos para las bacterias tales como las sales biliares y determinados antimicrobianos.

Este carbohidrato es antigénico y constituye el antígeno O o antígeno somático, uno de los antígenos fundamentales de las bacterias gramnegativas. Su especificidad varía con el número, composición y secuencia de sus azúcares, basándose en ello la serotipación de muchas especies bacterianas gramnegativas como las salmonelas, de las que se conocen cientos de serotipos diferentes [150, 333].

Además de las variaciones en la composición del antígeno O, respecto al tipo de azúcares que lo componen, existe variación en lo que respecta al número de unidades repetidas presentes en la cadena lateral del LPS. La mayoría de las bacterias gramnegativas sintetizan moléculas de LPS con cadena lateral de longitud completa, pero algunas especies sólo fabrican moléculas cortas del antígeno, y en algunos pocos casos casi no sintetizan polisacárido específico O. Además, se han aislado y estudiado células mutantes defectuosas en la síntesis de este antígeno O. Todas las formas químicas de LPS con cadena lateral muy corta (poco más de una unidad del tetrasacárido) o sin ninguna cadena lateral, se conocen como moléculas «rugosas» (R), en oposición a las moléculas «lisas» (L) de tamaño de cadena completo. Esta terminología se basa en la morfología de las colonias que producen cada tipo celular; así las bacterias que tienen un LPS truncado aparecen como colonias de bordes rugosos cuando crecen en placas de agar, en tanto que las que tienen moléculas de LPS con longitud completa aparecen como colonias lisas. De igual manera se ha demostrado, en cepas mutantes, que la presencia del antígeno O del LPS no es esencial para la viabilidad celular, aunque sí lo es la presencia del lípido A. Se debe tener en cuenta, sin embargo, que la presencia de antígeno O es importante para la resistencia a ciertos antimicrobianos, y puede serlo para la supervivencia en el huésped [333].

La biosíntesis del LPS es estrictamente secuencial y se inicia en la porción del lípido A a partir del cual se forma el oligosacárido de

la región central por adiciones sucesivas de azúcar, añadiéndose finalmente la cadena lateral O. La región más interna compuesta por el lípido A y los tres restos de KDO parecen ser esenciales, no así el resto de la molécula [150, 349, 443].

Los cationes juegan un papel crucial en la organización y el mantenimiento de la capa de LPS. Los iones como el Na^+, K^+, Ca^{2+} y, sobre todo, el Mg^{2+} estabilizan la membrana; de tal manera que si eliminamos estos iones con agentes quelantes podremos disociar totalmente la membrana externa; asimismo la adición de iones de Mg^{2+} la estabilizan. Esto es debido a que la parte proximal del sacárido del LPS tiene unos grupos cargados negativamente que se solapan y producen fuertes repulsiones electrostáticas entre las moléculas del LPS. Los cationes se sitúan entre ellos y evitan estas repulsiones [349].

Mecanismo de acción del LPS como endotoxina

El LPS es una toxina termoestable, que resiste incluso la esterilización en autoclave, y que es liberada por las bacterias gramnegativas al morir y lisarse. Esa actividad endotóxica se asocia con el componente lípido A y provoca un amplio espectro de efectos fisiopatológicos.

En pequeñas cantidades, la endotoxina, no entraña ningún peligro para la salud puesto que ya la flora gramnegativa del tubo digestivo genera pequeñas cantidades de endotoxina que llegan al hígado por vía portal, siendo metabolizadas por las células del sistema reticuloendotelial sin que el organismo sufra ningún daño.

En cantidades mayores, el LPS actúa como activador de una variedad de mediadores inflamatorios, lo que incluye activación de la cascada del complemento por la vía alternativa y activación del factor de necrosis tumoral e induce a los macrófagos y otras células como las células endoteliales a la producción de las interleucinas 1, 6 y 8, y las prostaglandinas. En cultivo celular, el LPS se muestra tóxico para los fibroblastos y otras líneas celulares. Además es pirógeno, activa los linfocitos B, causa agregación de las plaquetas, aumenta la resistencia a ciertos antimicrobianos, proporciona resistencia a la fagocitosis y desempeña un papel en la resorción ósea.

Cuando la cantidad de endotoxina presente en la sangre es suficientemente alta como en las bacteriemias y sepsis por bacterias gramnegativas, se produce el paso directo de la endotoxina a la circulación general, produciendo fiebre, leucopenia y alteraciones vasculares, pudiendo llegar al choque séptico irreversible, la coagulación intravascular diseminada y el colapso cardiovascular, produciendo la muerte en una o dos horas.

La patogenia de estos fenómenos no se conoce con certeza, pero diversas investigaciones han sugerido que pueden ser el resultado de la activación e interacción de diversos sistemas de proteínas plasmáticas, en especial de los sistemas del complemento, coagulación, fibrinólisis y quininas.

Así pues, en términos biológicos el LPS de las bacterias gramnegativas es uno de los componentes más activos, desde el punto de vista patógeno, de los procariotas [333].

La endotoxina, en cantidad suficiente, es capaz de activar:

1) El sistema del complemento por la vía alternativa, liberando fragmentos de C3a y C5a con acción quimiotáxica y anafilotóxica, que conduce a desgranulación de los polimorfonucleares y células cebadas, con la consecuente liberación de productos lisosómicos y sustancias vasoactivas.

2) La agregación y lisis plaquetaria, con liberación de sustancias vasoactivas (histamina, serotonina, quininas) que serían responsables del aumento de la permeabilidad vascu-

lar, de la vasoconstricción periférica y de la producción del choque séptico.

3) El factor de Hageman (factor XII de la coagulación), que a su vez activará el sistema intrínseco de la coagulación, el sistema de fibrinólisis y la precalicreína [394, 396].

4) Depresión directa de la función del ventrículo izquierdo y por tanto puede ser la principal mediadora de la disfunción y el colapso cardiovascular observado en el choque séptico, según sugiere un reciente estudio [141].

3.B) PROTEÍNAS

Las proteínas constituyen cerca de la mitad de la masa de la membrana externa; estas proteínas de la membrana externa, salvo raras excepciones, no son del mismo tipo que las que se encuentran en la membrana citoplásmica.
Se encuentra poca variedad de proteínas en la membrana externa de las bacterias gramnegativas, pero las que podemos encontrar se encuentran en gran número, lo que origina una cantidad total en peso mayor que la que se puede encontrar en la membrana citoplásmica. Algunas de estas proteínas atraviesan de parte a parte toda la membrana externa, por lo que se denominan **proteínas transmembrana**. A este grupo pertenecen una variedad de proteínas, conocidas como **porinas**, que tienen la particularidad de formar agregados de tres moléculas atravesadas por un poro o canal, lo cual hace que pongan en comunicación el espacio extracelular con el espacio periplásmico, permitiendo la difusión de moléculas hidrofílicas menores de 700 Da a través de la membrana. Las moléculas de mayor tamaño difunden a través de **proteínas de canal específico** que constituyen sistemas de transporte específicos para estos compuestos. Otro tipo de proteínas transmembrana son las **proteínas integrales** que podrían estar implicadas en el mantenimiento de la estructura de las membranas bacterianas y de la pared celular. Las **proteínas periféricas**, o de superficie, cuyo principal cometido es actuar de diana para determinadas sustancias o elementos como los fagos [191, 393].

Porinas

Las porinas son un tipo de proteínas transmembrana existentes en la membrana externa de las bacterias gramnegativas. Existe una amplia variedad de porinas que se diferencian por el tamaño del canal que forman y por las condiciones ambientales que estimulan su síntesis. El diámetro de estos poros oscila, como media, entre 1 y 1,2 nm, aunque en ocasiones puede llegar a los 2 nm como en el caso de la OprF de *Pseudomonas aeruginosa* o la "recién" descubierta OmpG de *Escherichia coli* K12 [136, 322], e incluso los 2,3 nm en *Spirochaeta aurantia* [349, 461]. Las porinas forman auténticos poros que constituyen canales de paso por los que penetran compuestos hidrofílicos de hasta 700 daltons excluyendo compuestos hidrofóbicos [150]. Están formadas por oligómeros (trímeros) de proteína en el que cada monómero tiene un peso molecular comprendido entre 32 y 48 kDa. Cada uno de estos monómeros consta de un canal cuyo poro se abre, por el lado extracelular, sobre la superficie externa de la membrana externa; posteriormente dicho canal se dirige hacia el centro del trímero de proteína, al nivel medio de la membrana externa, donde confluyen los tres canales que provienen de cada uno de los tres monómeros, en un único canal central que continúa su curso hasta desembocar, por el otro extremo del trímero de proteína, en la superficie de la hoja interna de la membrana externa, es

decir, en el espacio periplásmico por donde aparece como un poro sencillo.

Esto da una idea de la indivisibilidad funcional de una de estas estructuras. Cada monómero es un auténtico canal acuoso que permite el paso de múltiples sustancias, desde iones hasta antimicrobianos. La difusión de estos antimicrobianos a través de la membrana externa depende del número de moléculas de porinas presentes, de la naturaleza de dichas porinas en la que la composición en aminoácidos (carga y polaridad) condiciona fuertemente la arquitectura, y del carácter funcional de la porina. Este carácter depende sobre todo de la composición del bucle L3 que determina el diámetro del canal que forma el poro y deja pasar determinadas moléculas en función de su tamaño, su carga y su hidrofobicidad [349].

Hoy se conocen las estructuras cristalográficas de cinco de estas porinas y muestran trímeros de "barriles" β que consisten en cadenas β antiparalelas que atraviesan la membrana externa con una pequeña inclinación sobre la perpendicular. En cada una de las cinco porinas, el número real de cadenas β es 16 ó 18; sin embargo, análisis basados en genética molecular sugieren entre 8 y 32 cadenas para otras proteínas de la membrana externa. Las cadenas β se conectan, al lado del periplasma, por estiramientos cortos de aminoácidos que forman un codo β y, al lado externo, por largos bucles. Los residuos de cada uno de estos bucles se presentan de tres formas: se repliegan en el canal para formar la porción más estrecha del canal (bucle 3), o se extiende para contactar con un monómero adyacente (bucle 2) del trímero de la porina, o permanecen en la superficie (boca) del canal [191].

En la figura 2.4 se observa la estructura de la proteína OmpF [133].

Por otra parte, la estabilidad de estos oligómeros varía dependiendo de su fuente. En un extremo, los trímeros de *E. coli* y *S. typhimurium* son muy estables y no se disocian hasta que son desnaturalizados por calor en SDS. En el extremo contrario, la porina de *P. aeruginosa* se disocia en sus monómeros siempre que se extrae con SDS a temperatura ambiente. Los monómeros de porina de *E. coli* desnaturalizados durante el proceso de disociación son inactivos formando canales cuando se someten a un ensayo de reconstitución. Sin embargo, los monómeros de porina de *P. aeruginosa* muestran una alta actividad para formar canales durante el ensayo de reconstitución. De todas formas no está claro aún cómo las porinas pueden formar canales sin estar agregados en oligómeros dentro de bicapas o liposomas [228, 349].

Se ha sugerido que las porinas se clasifiquen en tres tipos: porinas generales que tienen una selectividad mínima por el sustrato, porinas específicas o de canal específico que son selectivas para el sustrato porque tienen un sitio de unión específico dentro del canal, y porinas de apertura selectiva [191] o de acceso específico que tienen canales que son normalmente inaccesibles, pero que se presume que pueden ser abiertos cuando se le una el correspondiente sustrato específico. Aunque son raros, se conocen casos específicos de porinas de canal específicas para un sustrato y porinas de apertura selectiva, que se encuentran involucradas en la penetración de moléculas de antimicrobianos; por ejemplo, la porina aminoácido-específica OprD de *Pseudomonas aeruginosa* es también una porina de canal específico para el imipenem. Sin embargo, los canales predominantemente involucrados en la penetración de moléculas de antimicrobianos son las porinas generales [191].

Tabla 14.- PORINAS DE LA MEMBRANA EXTERNA DE *ESCHERICHIA COLI*, *SALMONELLA TYPHIMURIUM*, Y OTRAS ENTEROBACTERIAS * [18, 45, 136, 294, 323, 340, 342, 349]

Especie bacteriana	Porina	Masa molecular del monómero (kDa)	Diámetro del poro (nm)	Tamaño molecular máximo de paso (daltons)
Escherichia coli	OmpK	40	1,1	ND
	Lc (HK 253)	40	1,3	ND
	NmpC	39,5	1,0 - 1,4	ND
	PhoE	36,8	1,1	ND
	Lc	36,5	ND	ND
	OmpC	36	1,1	ND
	OmpF	32,7	1,2	600
	OmpG	ND	2	ND
Salmonella typhimurium	OmpC (36K)	39,8	1,3	800
	OmpF (35K)	39,3	1,2	800
	OmpD (34K)	38	1,3	800
	PhoE	36	1,1	ND
Enterobacter cloacae	OmpD	40	1,6	ND
	OmpF	37	1,2	ND
	PhoE	37	1,1	ND
Citrobacter freundii	42K	42	ND	ND
	40K	40	ND	ND
	37K	37	ND	ND
Klebsiella pneumoniae	PhoE	37	1,1	ND
Proteus mirabilis	40K	40	1 - 1,18	ND
Proteus vulgaris	37K	37	1,26	ND

* Especies de enterobacterias estudiadas en esta tesis. ND = No Determinado

OmpC de *E. coli* es receptora para los fagos TuIb y Me1
OmpF de *E. coli* es receptora para el fago TuIa
OmpF es reprimida por temperatura y presión osmótica elevadas
OmpK está presente en cepas capsuladas de *E. coli* K12
OmpD, descrita en *S. typhimurium* y *E. cloacae*, no está presente en *E. coli*
PhoE se expresa en respuesta a disponibilidades deficitarias de fosfato.
Lc es la proteína 2, codificada por profago en *E. coli*
OmpS1 es otra porina que parece haberse descubierto en *Salmonella typhi* [137, 361]

Las porinas OmpC y OmpF

En *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, se han descrito dos porinas mayores, la OmpC y la OmpF. La síntesis de estas porinas está controlada por la presión osmótica y la temperatura. La inclusión del 10% de sacarosa en el medio de cultivo y el aumento simultáneo de la temperatura de crecimiento a 42 °C, reprime la producción de la porina OmpF. Debido a ello, se presume que esta porina es expresada por la bacteria cuando tiene que sobrevivir fuera del cuerpo de animales de sangre caliente, en ambientes de baja osmolaridad y baja temperatura; igualmente, su mayor diámetro de poro le confiere ventajas para asimilar los nutrientes de este tipo de entorno [349]. En estas dos especies la disminución cuantitativa de la porinas conlleva un aumento de la resistencia a los β-lactámicos y otros antimicrobianos por impermeabilidad de la membrana.
En cepas de *Escherichia coli* K12 se ha descrito un nueva porina, la OmpG, que presenta el mayor tamaño de poro conocido en este género con un diámetro de 2 nm [136].

En *Escherichia coli*, la pérdida de la porina OmpC no modifica la CMI a β-lactámicos, debido a que éstas pasan preferentemente por la OmpF quizás porque posee un tamaño de poro ligeramente más grande que el de la OmpC [461].
Los mutantes de *Escherichia coli* desprovistos de la porina OmpF son de 4 a 8 veces más resistentes a la ampicilina y a la cefoxitina, aunque no varían su sensibilidad a la cefaloridina que es un antibiótico con carga global neutra (zwitteriónico).

La ausencia conjunta de la dos porinas OmpC y OmpF aumenta aún más la resistencia y disminuye la permeabilidad a los β-lactámicos, incluyendo en este caso a los antibióticos como la cefaloridina, al cual aumenta la resistencia de 8 a 16 veces. De todas maneras, el efecto de estas mutaciones, es poco marcado para la mayoría de los β-lactámicos y en particular para la cefalosporinas de tercera generación donde la CMI aumenta sólo de 2 a 4 veces; excepción hecha del moxalactam, sustancia dianiónica, en el que la CMI aumenta de 4 a 8 veces [497].

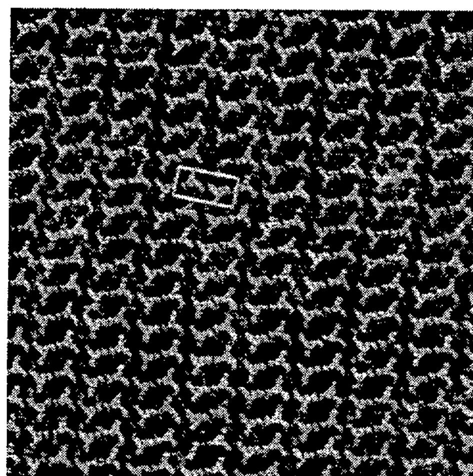


Figura 2.4.- Superficie periplásmica de trímeros de porina OmpF reconstituida en un cristal 2D observada mediante Microscopía de Fuerza Atómica (MFA) en una solución 300 mM de KCl y 10 mM de Tris-HCl, a pH 7.4. Los trímeros exhiben una protusión de 4-5 Å desde la superficie de la bicapa que separa los tres canales elípticos. El rectángulo blanco marcado mide 79x138 Å y la profundidad de la capa es de unos 15 Å [133].

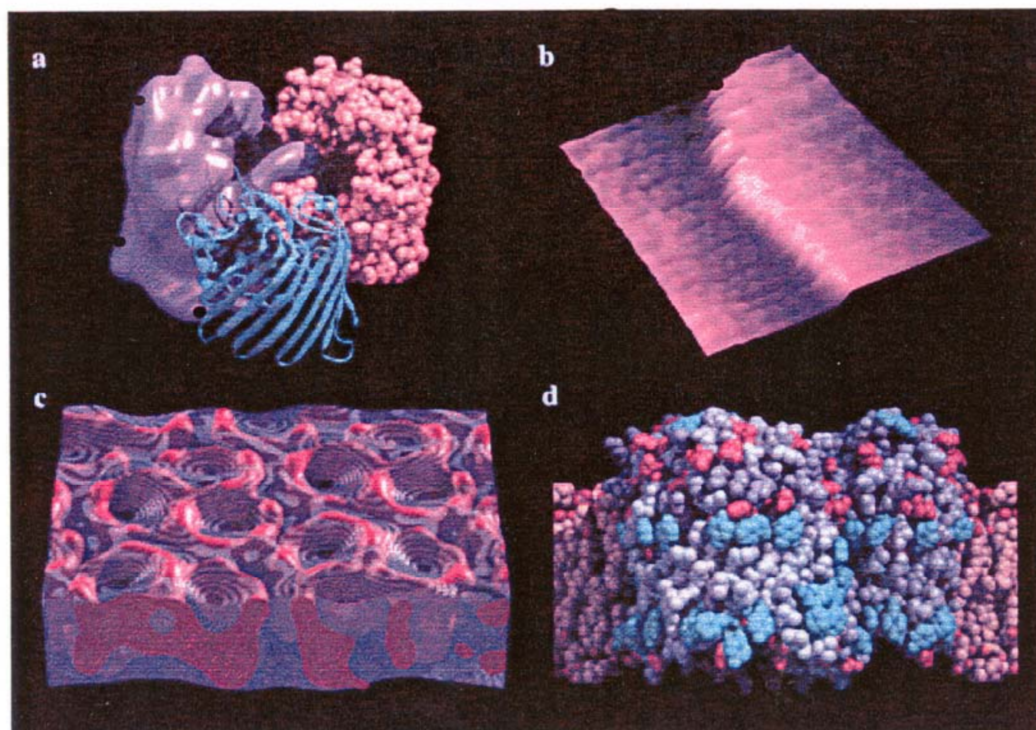


Figura 2.5.- Modelos atómicos de la porina OmpF obtenidos a partir de cristales 2D porina-lípido.

a) Cristalografía de rayos X del trímero de porina de OmpF: La cinta verde representa el plegamiento en barril beta encontrado en los canales de porinas. La superficie azul representa un mapa de la densidad electrónica calculado con una resolución de 15 Å a partir de la estructura atómica, la cual se representa en color ámbar.

b) Topografía de una superficie experimental del pliegue de una doble capa reconstituida de cristales 2D porina-lípido como se ve con MFA.

c) Mapa de densidad electrónica de los trímeros de porina de un cristal 2D porina-lípido reconstituido, visto mediante topografía de superficie con MFA y una resolución de 15 Å.

d) Moléculas de DMPC (clorhidrato de 3-cloro-*N,N*-dimetilpropilamina) modeladas a escala atómica para el estudio de las interacciones proteína-lípido [197].

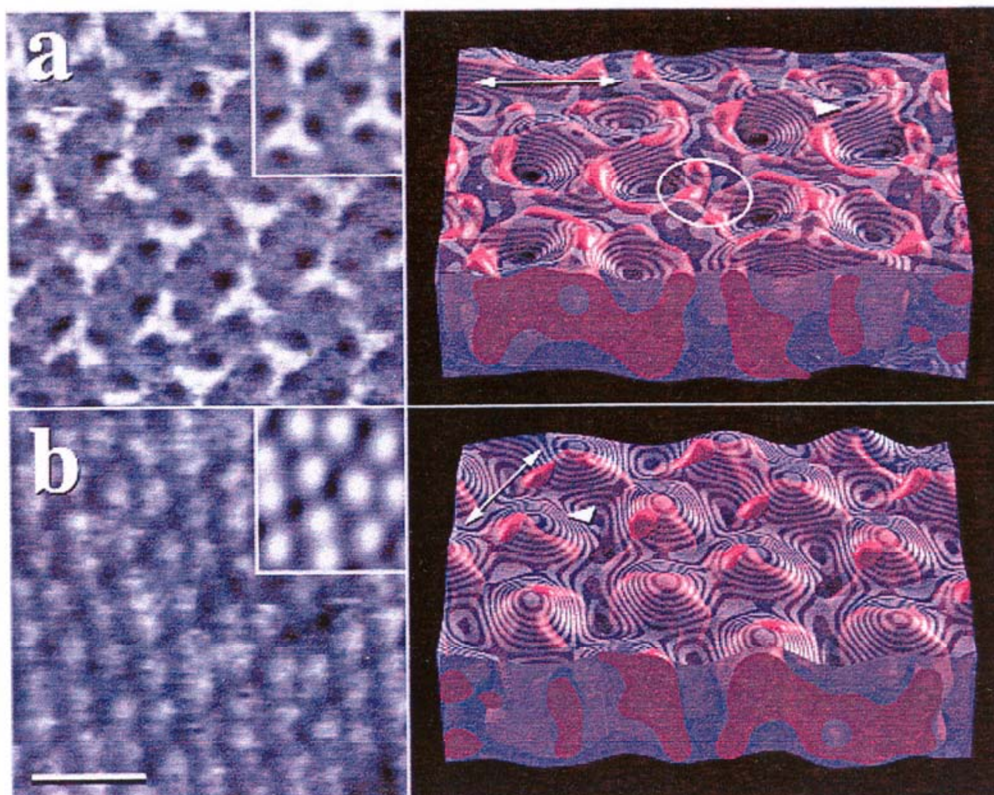


Figura 2.6.- Topografías de superficie mediante MFA representando la superficie periplásmica (A) y extracelular (B) de cristales de porina-fosfolípido de OmpF con sus correspondientes modelos de los trímeros de porina derivados de su estructura atómica.

Los contornos tipo cebra (azul claro y oscuro) que recubre la topografía transparente de la MFA, marca zonas de elevación similar con una diferencia de ±1Å, siendo el grosor de una capa de unos 61 Å ± 2 Å.

(A) Topografía de la superficie periplásmica (izquierda). La resolución lateral fue de 8-15 Å. La estructura de los trímeros de porina de OmpF fue representada a 15 Å de resolución lateral (derecha) para generar un modelo de la proteína (rojo) dentro del cristal 2D (azul).

(B) Topografía de la superficie extracelular (izquierda). En el modelado se presentan las tres protuberancias del trímero en el centro, rodeado por trímeros adyacentes. Los triángulos marcan un triple eje de un trímero de porina. La barra de escala representa 10 nm [431].

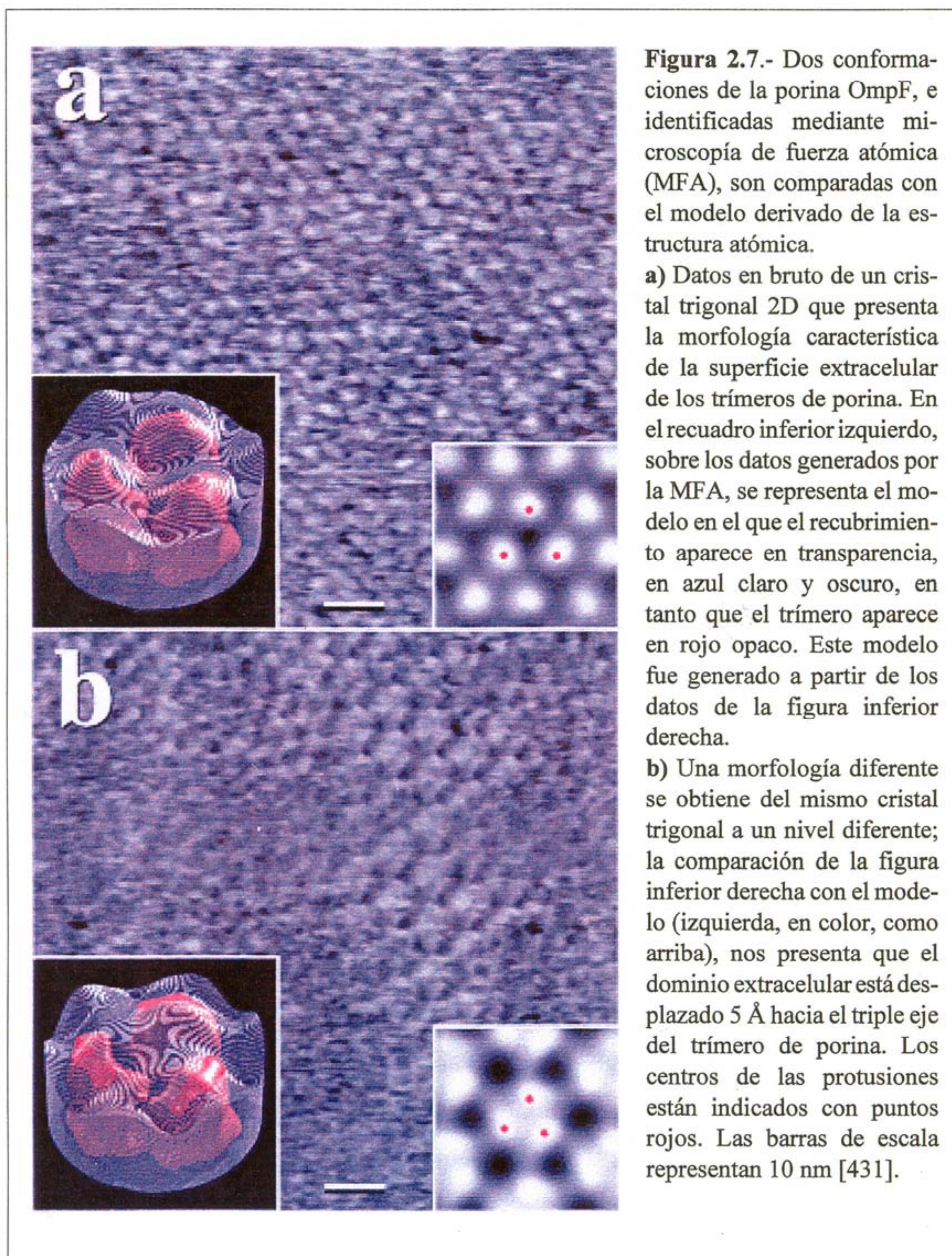


Figura 2.7.- Dos conformaciones de la porina OmpF, e identificadas mediante microscopía de fuerza atómica (MFA), son comparadas con el modelo derivado de la estructura atómica.

a) Datos en bruto de un cristal trigonal 2D que presenta la morfología característica de la superficie extracelular de los trímeros de porina. En el recuadro inferior izquierdo, sobre los datos generados por la MFA, se representa el modelo en el que el recubrimiento aparece en transparencia, en azul claro y oscuro, en tanto que el trímero aparece en rojo opaco. Este modelo fue generado a partir de los datos de la figura inferior derecha.

b) Una morfología diferente se obtiene del mismo cristal trigonal a un nivel diferente; la comparación de la figura inferior derecha con el modelo (izquierda, en color, como arriba), nos presenta que el dominio extracelular está desplazado 5 Å hacia el triple eje del trímero de porina. Los centros de las protusiones están indicados con puntos rojos. Las barras de escala representan 10 nm [431].

Biosíntesis de las porinas OmpF y OmpC y su papel en la resistencia a antimicrobianos.

La biosíntesis de las porinas está regulada por numerosos genes en los que la expresión depende de las condiciones ambientales de la bacteria. En *Escherichia coli* y *Salmonella* la expresión de los genes *ompF* y *ompC* está sometida a un mecanismo complejo de regulación transcripcional por los genes de control *ompR* y *envZ* donde la acción está básicamente regulada por las condiciones de osmolaridad del medio. La proteína EnvZ, que constituye el elemento sensible de este sistema de osmorregulación, es capaz de fosforilar a la OmpR que interviene entonces sobre la transcripción de *ompF* y *ompC*. Otros genes como el *micF* pueden impedir la expresión de *ompF* mediante la síntesis de un ARN inverso capaz de impedir la traducción del ARNm de la OmpF [46, 130, 304, 310].

Estos genes pueden sufrir múltiples mutaciones y abolir la expresión de los genes *ompF* y/o *ompC*, dando lugar a la aparición de resistencia cruzada con los antimicrobianos que utilizan la vía de las porinas como los β-lactámicos, las quinolonas, el cloranfenicol, las tetraciclinas y el trimetoprim. Aunque los aminoglucósidos pueden utilizar la vía de las porinas, no se ha demostrado ninguna resistencia cruzada directamente relacionada con la reducción de la permeabilidad debido a la disminución del número de porinas en las enterobacterias. Asimismo la resistencia cruzada que pueda originarse entre los diferentes antimicrobianos, se acompaña sólo de un aumento de 4 a 8 veces la CMI de base para el antimicrobiano en cuestión [340].

Enterobacter sp. está tomando un papel preponderante en las septicemias por bacterias gramnegativas debido a que una de sus características más importantes es la aparición, durante el tratamiento, de resistencias a los antimicrobianos, y en particular cuando para dicho tratamiento se utilizan cefalosporinas como moxalactam, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefoperazona y ceftizoxima. Estas resistencias se explican por un mecanismo doble: por una parte se produce una hiperproducción de cefalosporinasas cromosómicas, que es el mecanismo más frecuentemente encontrado, y por otra parte una disminución de la permeabilidad a los β-lactámicos derivada de una reducción en la producción de las porinas OmpF y OmpD [340].

El papel de las porinas en la resistencia a quinolonas por impermeabilidad de la membrana externa se trata con más detalle en el apartado correspondiente de la página 62.

Proteínas de canal específico

Además de los canales inespecíficos formados por las porinas, la membrana externa contiene canales formados por otras proteínas que constituyen sistemas de transporte específicos para que las moléculas de mayor tamaño puedan difundir a través de la membrana. Las más importantes y relativas a este estudio se exponen en la tabla 15.

LamB es una proteína transmembrana con un peso molecular de 47,4 kDa. Su composición en aminoácidos no es particularmente hidrofóbica y al igual que las porinas forma trímeros estables con estructura de hoja β con una asociación no covalente al peptidoglicano [342].

Tabla 15.- PROTEÍNAS DE CANAL ESPECÍFICO DE LA MEMBRANA EXTERNA DE *ESCHERICHIA COLI* Y *SALMONELLA TYPHIMURIUM* [323, 349, 443].

Especie bacteriana	Proteína	Estructura y Función
Escherichia coli	LamB	• Específica para la entrada por difusión de maltosa y maltodextrinas. • Maltoporina inducida por maltosa. • Lugar de adsorción del fago λ. • Diámetro de poro: 1,4 nm PM=47,4 kDa
	Tsx	• Específica para la entrada por difusión de nucleósidos. • Lugar de adsorción del fago T6.
	TonA (FhuA)	• Específica para la entrada por dilución de ferricromo. • Lugar de adsorción de los fagos T1 y T5.
Salmonella typhimurium	LamB	• Parece ser específica para la entrada por difusión de maltosa y maltodextrinas.

La proteína de membrana externa OmpA

Ésta es una proteína transmembrana muy abundante en la membrana externa. No ha sido definida con claridad su función específica, pero las cepas mutantes que carecen de ella producen una membrana externa más frágil, por lo que parece que dicha proteína contribuye de algún modo a mantener la integridad estructural de la membrana externa. En base a la gran evidencia experimental, se desarrolló un modelo para la disposición de las proteínas en la membrana externa. La OmpA está incrustada enmedio de la membrana externa y abarca aproximadamente los residuos del 1 al 170, estando la parte C-terminal inmersa en el periplasma. Se piensa que la parte correspondiente a la membrana externa es debida a que la proteína la cruza ocho veces en la forma de cadena β antiparalela y forma un barril β anfifílico.



Figura 2.8.- Estructura 3D de un cristal de la proteína OmpA [371, 372].

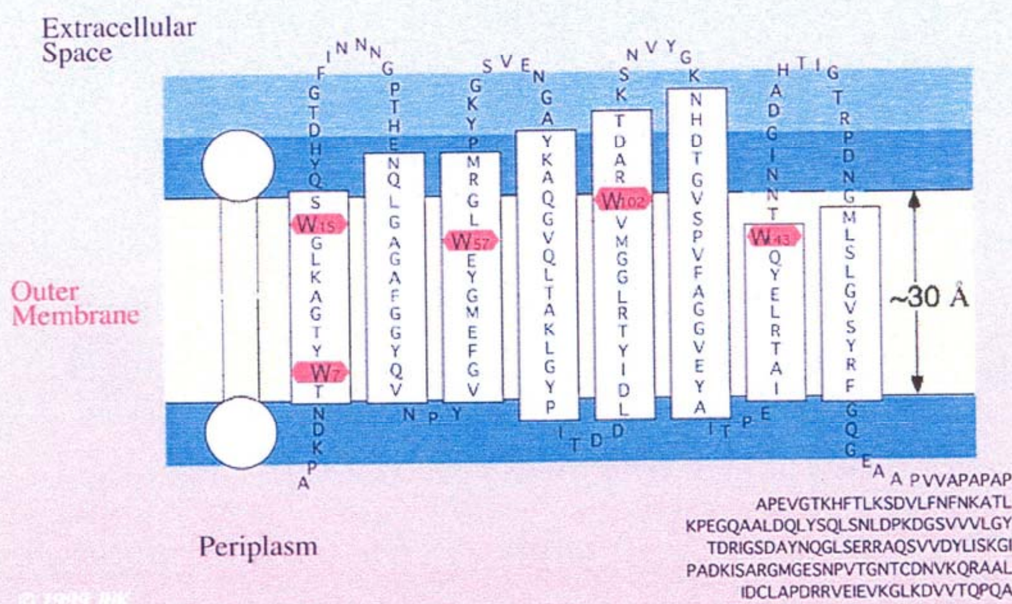


Figura 2.9.- El dominio transmembrana de la OmpA (residuos 1-171) [255, 256].

De esta forma, las regiones alrededor de los residuos 25, 70, 110, y 154 quedan expuestos en la superficie celular.
La OmpA, aislada y desnaturalizada mediante urea, puede ser renaturalizada mediante la adición del lipopolisacárido (LPS) completo, o sólo del lípido A. Por consiguiente, la proteína probablemente esté asociada con el LPS en la membrana externa. Al igual que otras proteínas externas, la OmpA se sintetiza inicialmente como un precursor. La translocación de la proteína por la membrana citoplásmica involucra una maquinaria de exportación, la cual está codificada por los genes *sec/prl* [143, 446, 447].
La proteína OmpA de *E. coli* parece que puede entrecruzarse con otras proteínas OmpA de la membrana y con la capa inferior de peptidoglicano. Los mutantes que carecen de esta proteína poseen una membrana inestable y funciones de conjugación defectuosas. Se piensa que funciona como receptor para los fagos TuII y K3 [342].
Parece ser necesaria en la conjugación mediada por el plásmido F para estabilizar el conjunto. No obstante la proteína OmpA inhibe la conjugación cuando se añade conjuntamente con el LPS [143, 342].

Cuando la proteína OmpA de *E. coli* se calienta a 100 °C, en presencia de SDS, su peso molecular aparente en geles de electroforesis de SDS-poliacrilamida se incrementa desde 28 kDa a 32 kDa. La adición de LPS a la OmpA calentada causa su renaturalización en la forma compacta y de migración rápida; aunque el LPS no es absolutamente necesario en este proceso puesto que el mismo fin se consigue en presencia de 0,3 M de ClNa [255, 256].

La secuencia y posición relativa de los aminoácidos en la proteína OmpA de *Escherichia coli* puede verse en la figura 2.9 [255, 256]. La secuencia de residuos de aminoácidos de la posición 176 a 187 es la siguiente: Ala-Pro-Val-Val-Ala-Pro-Ala-Pro-Ala-Pro-Ma-Pro, la cual es muy semejante a la de la región "bisagra" de las inmunoglobulinas [342, 349, 371, 372].

3.C) LA IMPORTANCIA COMO BARRERA DE LA MEMBRANA EXTERNA

Concretamente, cuatro son los mecanismos principales que puede utilizar una bacteria para aumentar su resistencia a la actividad de un antimicrobiano: inactivación enzimática, modificación del blanco celular de la droga, expulsión fuera de la célula y disminución o ausencia de penetración del agente antibacteriano en la célula.
Este último mecanismo, el de la impermeabilidad celular, es un mecanismo de resistencia no enzimático, particular de las bacterias gramnegativas y que no afecta a las bacterias grampositivas, debido al hecho de que no poseen membrana externa. Este tipo de resistencia es consecuencia de mutaciones cromosómicas que afectan a la composición de dicha membrana.

En las bacterias gramnegativas existen tres ***tipos de acceso*** que permiten el paso de diferentes sustancias a través de la membrana externa. El primero es un **mecanismo de difusión pasiva** que se realiza a través de porinas y que permiten la difusión de sustancias hidrófilas. El segundo es un **mecanismo de difusión facilitada**, relacionado con la presencia de proteínas con una estructura semejante a la de las porinas; su composición en aminoácidos y la carga de estos últimos permiten la difusión facilitada de sustancias que, en otro caso, sólo penetrarían muy lentamente a través de las porinas clásicas [349].
No se conocen bien los detalles de la penetración de moléculas hidrófobas a través de la membrana externa. Se suponía que la alta

resistencia de la mayoría de las bacterias gramnegativas a los antimicrobianos hidrófobos indicaba que la membrana externa constituía una potente barrera de exclusión para tales sustancias. Sin embargo, se ha comprobado que los mutantes defectivos para las vías de expulsión específicas, sin cualquier otra alteración de la membrana externa conocida, son en general considerablemente más susceptibles a los de apertura selectiva hidrófobos. Determinados estudios con esteroides han sugerido que la bicapa de la membrana externa presenta una velocidad de infiltración al menos 10-100 veces menor que las de las bicapas fosfolipídicas. Parece, pues, que la membrana externa retarda el paso de los de apertura selectiva hidrófobos, aunque no tanto como previamente se pensaba, debido probablemente a la alta carga de la superficie y a su estabilización por cationes divalentes que actúan inhibiendo el reparto de estos de apertura selectiva en el interior hidrófobo de la bicapa [191, 342].
Además de la difusión pasiva y la difusión facilitada, existe un tercer sistema de penetración de sustancias por la célula gramnegativa. Este sistema es el **mecanismo de penetración autoactivada** y concierne a la penetración de compuestos policatiónicos, como los aminoglucósidos, las polimixinas y los péptidos policatiónicos naturales. Estas moléculas interactúan con los sitios de unión de los cationes divalentes situados en la superficie de las moléculas del LPS y, debido a que tienen una afinidad por estos sitios de 2 a 4 veces mayor que la de dichos cationes, los desplazan competitivamente de su sitio. Esto induce una distorsión de la estructura de la membrana externa y la consecuente permeabilización de dicha membrana para estos compuestos, que abarcan a una amplia variedad de sustancias incluyendo moléculas hidrófobas, diversos de apertura selectiva e incluso la lisozima [191, 340].

El efecto de la carga iónica es importante para la difusión a través de la membrana. Se ha descubierto que los solutos con carga negativa atraviesan los canales de las porinas OmpF y OmpC de *E. coli* mucho más lentamente que las sustancias catiónicas; sin embargo ocurre todo lo contrario al atravesar la porina PhoE, cuya producción está inducida por la carencia de fosfato. Lo mismo que con PhoE ocurre con la porina de *Neisseria gonorrhoeae* [170, 342, 349, 421, 423].

El efecto de la hidrofobicidad de las sustancias en la permeabilidad de las membranas ha sido estudiado por diferentes investigadores, llegando a la conclusión de que la permeabilidad está en relación inversa a la hidrofobicidad del soluto. Es decir, cuanto más hidrofóbica sea la sustancia, menos permeable será la membrana. La relación varía, por supuesto, dependiendo del tamaño de la molécula, del tipo de porina y diámetro de su canal, de la especie bacteriana, e incluso de si la porina en cuestión pertenece a una célula viva o a un liposoma [349].

El efecto del campo eléctrico es interesante, pues se ha observado que, aplicando diferencias de potencial de130-140 mV a membranas planas reconstituidas a partir de membranas externas, se puede conseguir el cierre de todos los canales de porinas, lo que indica que dicho canal está controlado por voltaje como en las porinas mitocondriales, también conocidas como VDAC (*Voltage-Dependent Anion Channel*) [342, 349].

La **medida de la permeabilidad** de la membrana externa en células intactas se ha demostrado difícil debido a la presencia de dos membranas celulares. Además, la penetración se realiza generalmente por difusión pasiva en lugar de por captación activa, lo cual crea problemas con la sensibilidad de la medida a concentraciones del sustrato fisiológicamente significantes. El primer problema ha sido resuelto aportando enzimas en el periplasma para "capturar" el sustrato cuando cruza la membrana externa. La interacción de los

sustratos agregados externamente con estas enzimas está limitado por la proporción de entrada en el periplasma y, así, la proporción de sustrato que se convierte en productos, por unidad de tiempo, es una medida de la proporción de difusión por la membrana externa. La aplicación más utilizada de este procedimiento general es el método de Zimmermann y Rosselet, donde se mide la relación de hidrólisis, por células intactas, de compuestos en el medio. Los compuestos atraviesan los canales de porina y posteriormente son hidrolizados en el periplasma por las enzimas. Aplicando la primera ley de Fick de la difusión al primer paso y la ecuación de Michaelis-Menten al segundo, obtendremos el coeficiente de permeabilidad de la membrana externa [349]. Este método se ha aplicado a los β-lactámicos, usando la β-lactamasa periplásmica como la enzima de captura. Las mejoras metodológicas han permitido la medida de la proporción de penetración a concentraciones próximas a las de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del β-lactámico. Los coeficientes de permeabilidad reales para dichos antibióticos ya han sido descritos. Para tener una idea de dicho coeficiente de permeabilidad, puede calcularse el efecto barrera en *E. coli*, basándonos en el número aproximado de moléculas de porina (2×10^5 porinas/célula) y limitando su área de difusión a la zona más estrecha del canal de la porina de OmpF (0,77 nm^2) para obtener un área total de difusión por célula de 0,15 μm^2. Como el área de la superficie de la célula de *E. coli* es de unos 3 μm^2, podemos decir que sólo un 5% de la superficie celular está disponible para la difusión [191, 340, 349].

El gran tamaño de los β-lactámicos, comparado con las zonas de estrechamiento internas de las porinas, crea fricciones e interacciones moleculares entre el β-lactámico y los aminoácidos que conforman el canal de la porina, lo que es difícil de estimar pero probablemente impide la difusión del β-lactámico por lo menos 100 veces. Este hecho induce a pensar que la proporción de difusión de los β-lactámicos y su consecuente acceso a los blancos celulares (PFP's de la superficie externa de la membrana citoplásmica), probablemente esté disminuida más de 1000 veces debido a la presencia de una membrana externa semi-permeable [191].

Las medidas de penetración de diferentes β-lactámicos han demostrado ciertos principios generales. Primero, cada bacteria individualmente puede diferir sustancialmente en su permeabilidad a los β-lactámicos. Segundo, la naturaleza química de cada β-lactámico puede influenciar altamente su tasa de infiltración. Tercero, como el interior de canales de las porinas está formado normalmente por aminoácidos con un exceso de carga negativa (casi todas las porinas son proteínas ácidas), está favorecido el paso de β-lactámicos zwitteriónicos (que pueden originar iones dipolares) en lugar de las moléculas cargadas negativamente. De la misma manera, los β-lactámicos de pequeño tamaño que tienen limitada masa, difundirán más rápidamente a través de los canales de porina [191, 349, 497].

Se han utilizado varios **métodos para aumentar la permeabilidad** de la membrana externa y hacer la bacteria más susceptible a los antimicrobianos:

- Alteraciones mutacionales de macromoléculas específicas de la membrana externa.
- El uso de quelantes de policationes o cationes divalentes.
- La ingeniería genética de bacterias para aumentar la porosidad de la membrana externa.

Por ejemplo, la interacción de policationes con los sitios de unión de cationes divalentes de la superficie del LPS de las bacterias gramnegativas causa permeabilización de la membrana externa. Esto puede aumentar la penetración de una gran variedad de antimicrobianos y una consecuente reducción de la CMI, como ocurre con el nonapéptido poli-

mixina B y determinados péptidos antimicrobianos catiónicos. Un efecto similar se observa con quelantes de cationes divalentes, así como con el ácido etilen-diamino-tetraacético (EDTA) y su habilidad para permeabilizar la membrana externa, actuando sinérgicamente con muchos antimicrobianos en varias especies bacterianas.

Se ha demostrado recientemente la importancia del aumento de la porosidad de la barrera de la membrana externa, usando procedimientos de genética molecular. Una eliminación de ocho aminoácidos en el 5° bucle de la porina específica OprD de *Pseudomonas aeruginosa* aumentó en más de 20 veces la permeabilidad iónica de este canal. Cuando se clonó en *Pseudomonas aeruginosa* esta porina OprDΔL5, condujo a una reducción en las CMIs de 8 a 16 veces para los β-lactámicos, quinolonas, tetraciclinas y cloranfenicol; todos los cuales se presumen que cruzan la membrana externa a través de la porina; pero no ocurrió lo mismo con los aminoglucósidos y la polimixina B, que utilizan la vía de la penetración por autoactivación [191, 349].

Resistencia debida a la baja permeabilidad de la membrana

Ciertas bacterias muestran una alta **resistencia intrínseca a todo tipo de antimicrobianos**, incluyendo los hidrófilos. Tales bacterias incluyen *P. aeruginosa, Burkholderia (Pseudomonas) cepacia, Stenotrophomonas (Xanthomonas/Pseudomonas) maltophilia* y *Acinetobacter baumannii (calcoaceticus)*. Cada una de estas especies es deficiente en porinas y tiene una permeabilidad de la membrana externa a β-lactámicos que es del 1% al 5% de la de *E. coli*. Esto, unido a otros eficaces mecanismos de resistencia como β-lactamasas inducibles y sistemas de expulsión activa, hace a estas bacterias resistentes a la mayoría de los antimicrobianos y difíciles de tratar en la clínica. Aunque se han desarrollado antimicrobianos eficaces para las cepas del tipo salvaje de estas especies, no obstante, incluso para estos antimicrobianos, la CMI usual es tan alta que una pequeña alteración mutacional es suficiente para elevar la CMI a un nivel que hace intratable clínicamente la bacteria con ese antimicrobiano. Por ejemplo, los más recientes β-lactámicos (cefpiroma y cefepima), que representan a las cefalosporinas de cuarta generación, tienen CMIs para *P. aeruginosa* que son 60 veces mayores que las necesarias para *E. coli* [191, 469].

Ciertas especies bacterianas poseen una **resistencia intrínseca a los antimicrobianos policatiónicos** y, aunque la mayoría de las bacterias son susceptibles a ellos, siendo los aminoglucósidos unos de los antimicrobianos más fiables disponibles para el médico, sin embargo, se sabe bien que *B. cepacia* es muy resistente a los antimicrobianos policatiónicos, aminoglucósidos y polimixinas. Ello es el resultado de la incapacidad de los policationes para interactuar con la membrana externa, probablemente porque la baja concentración de fosfato y el alto contenido en arabinosamina del LPS de *B. cepacia* evitan la unión de policationes y cationes divalentes, y en consecuencia la penetración por autoactivación [191, 349, 469].

Se han descrito **mutantes deficientes en porinas** de varios géneros de enterobacterias como resultado de la terapia clínica con antimicrobianos. Los mutantes deficientes en porina de *E. coli*, obtenidos en el laboratorio, son de 2 a 16 veces más resistentes que las cepas madre a los β-lactámicos y de 2 a 4 veces más resistentes a otros antimicrobianos, como las fluoroquinolonas, que usen la vía de entrada de las porinas [96, 135, 196, 203, 204, 221, 239, 329, 385, 387]. También se han descrito mutantes deficientes en otras especies de enterobacterias que son deficientes en porinas con función similar a la porina F de *E. coli*, tal es el caso de las descripciones hechas en *E. cloacae* [4, 84, 168, 185,

290, 296, 347, 398], *E. aerogenes* [84, 90], *Klebsiella pneumoniae* [164, 185, 306], *Salmonella* sp. [182, 184, 316, 324, 386, 462], *Citrobacter freundii* [18, 294] y *Proteus vulgaris* [233], entre otros. Una de las deficiencias más comunes de las porinas es la pérdida de la porina OprD, específica para las carbapenemas, en *P. aeruginosa* y que ocurre en casi el 50% de los pacientes tratados con el imipenem [158, 191, 287, 288, 341, 436, 487].

Mecanismos internos de resistencia

Considerando que en *E. coli* los β-lactámicos llegan a producir un equilibrio de paso a través de la membrana externa en un tiempo inferior a un segundo y que incluso en una bacteria poco permeable como *P. aeruginosa* el tiempo de equilibrio es normalmente tan pequeño como 10-100 segundos, se puede decir que no es probable que se produzca resistencia debido sólo a la baja permeabilidad de la membrana externa. Sin embargo, la permeabilidad de la membrana externa es extremamente importante para la susceptibilidad al antimicrobiano porque, disminuyendo la permeabilidad de la membrana externa se incrementa la resistencia a los antimicrobianos y, aumentando su permeabilidad, se produce un incremento de la susceptibilidad. Por consiguiente, está claro que deben existir mecanismos internos de resistencia que se aprovechan del movimiento relativamente lento de los antimicrobianos hacia el periplasma. Se han descrito dos mecanismos de resistencia de este tipo: las β-lactamasas y los sistemas de expulsión activa.

Se puede producir resistencia a los β-lactámicos, mediante la producción de β-lactamasa en el periplasma, incluso para aquellos β-lactámicos que son poco hidrolizados por esta enzima [340].

La resistencia intrínseca a β-lactámicos involucra generalmente una sinergia entre una permeabilidad restringida de la membrana externa y la enzima cromosómica cefalosporinasa C, que es inducida por el β-lactámico mismo. La resistencia por mutación a β-lactámicos, y especialmente la resistencia clínica, es producida generalmente o bien por β-lactamasas codificadas por plásmidos o, en ciertas especies, por la desrepresión (mutaciones del *ampD*) de β-lactamasas cromosómicas. En ambos casos, la influencia del incremento de la expresión de β-lactamasas es amplificada por la restricción del paso de los β-lactámicos a través de la membrana externa [161, 191, 222, 229, 318, 424, 475].

Los recientes estudios han enfatizado la importancia de la expulsión activa en las resistencias intrínsecas y mutacionales a los antimicrobianos. Así, la eliminación por mutación del principal sistema de expulsión activa en una especie dada puede reducir las CMIs para los antimicrobianos hidrófobos en unas 100 veces y, para los antimicrobianos anfipáticos y relativamente hidrófilos, en unas 2 a 8 veces. Recíprocamente, la sobreexpresión mediante mutaciones de ciertos sistemas de expulsión activa puede producir resistencia a una amplia variedad de antimicrobianos.

Sin embargo, estos sistemas de expulsión de antimicrobianos y otras moléculas son mecanismos de resistencia secundarios, porque aumentando la permeabilidad de la membrana externa por mutación, tratamiento con policationes o por sobreexpresión de la porina, se puede rebasar la capacidad del sistema de expulsión activa dando lugar a unas CMIs similares a las observadas con mutantes que han perdido su vía de expulsión predominante.

El mecanismo detallado del funcionamiento del sistema de expulsión activa todavía está estudiándose, pero los sistemas de expulsión más importantes en bacterias gramnegativas son los sistemas RND (resistencia, nodulación y división). Estos RND están constituidos por tres elementos [191, 345, 454, 455]:

- una proteína en la membrana citoplásmica, que actúa como bomba energética de baja especificidad.
- una proteína periplásmica de unión, de función desconocida.
- una proteína de la membrana externa, que puede funcionar como una porina "de apertura selectiva".

Resistencia por impermeabilidad a las quinolonas

En las bacterias gramnegativas, las quinolonas pueden difundir pasivamente a través de la membrana externa. Difunden en parte a través de las porinas, pero no es imposible que puedan pasar a través de la capa lipídica después de la desestabilización de los puentes de magnesio que unen las moléculas del LPS [253, 268]. A nivel de la membrana citoplásmica, difunden pasivamente hacia el interior de la célula. Este paso es contrarrestado, en el caso de las fluoroquinolonas, mediante un mecanismo de expulsión activa que tiende a devolver hacia el espacio periplásmico a las moléculas que hayan penetrado en el citoplasma. Las moléculas que queden en el citoplasma se van a fijar al complejo ADN girasa-ADN.

La alteración de la diana por mutación puntual de la ADN-girasa representa el modo de resistencia más frecuente a las quinolonas [115, 118, 181, 384, 398, 404, 414, 483]. Debido a ello se produce un fuerte aumento de la CMI al ácido nalidíxico (× 40 en *E. coli*) y generalmente un menor aumento de dicha CMI para las fluoroquinolonas. Asimismo podemos encontrarnos, cada vez con más frecuencia, con cepas que presentan altos niveles de resistencia a las fluoroquinolonas debido a varias mutaciones de la ADN-girasa o bien por la presencia simultánea de múltiples mutaciones que afectan no sólo a las topoisomerasas bacterianas, sino también a la expresión de porinas y/o sistemas de expulsión activa. Aún así, la mayor parte de los mutantes de permeabilidad a las quinolonas presentan un bajo nivel de resistencia con una CMI ≈ 2 a 8 mg/l [234, 253, 340, 475, 487].

El incremento de resistencia a quinolonas y otros antimicrobianos por impermeabilidad de la pared bacteriana se ha descrito no sólo en *E. coli* [96, 135, 196, 203, 204, 221, 329] sino también en *Klebsiella pneumoniae* [164, 185, 306, 483], *E. cloacae* [4, 84, 168, 185, 290, 296, 306, 347, 398], *Salmonella* sp. [182, 184, 316, 324, 386, 462] y *Citrobacter freundii* [294].

En el caso de *E. coli*, estas mutaciones afectan más a menudo a la síntesis de la porina OmpF, describiéndose mutantes Mar en los que el gen responsable *marA* aumenta la expresión del gen *micF* que, codificando un ADN inverso del ARNm de la OmpF, entraña una inhibición postranscripcional del gen *ompF* y la ausencia de síntesis de la porina OmpF [97, 164, 220, 487]. Esto provoca en ciertos mutantes una resistencia cruzada entre los antimicrobianos no estructuralmente relacionados como las tetraciclinas y el cloranfenicol, y a un menor nivel los β-lactámicos.

Curiosamente tales mutantes resistentes a las quinolonas pueden ser seleccionados por la tetraciclina y el cloranfenicol con una frecuencia 1000 veces mayor que con las quinolonas [96, 220]. Esta resistencia a las quinolonas cruzada con otros antimicrobianos es encontrada en numerosas especies bacterianas seleccionadas como *Klebsiella pneumoniae* [164], *Enterobacter cloacae* [109, 258, 269], *Enterobacter aerogenes* [296], *Proteus vulgaris* [233], *Citrobacter freundii* [18], *Serratia marcescens*, *Salmonella* sp. [109], *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas cepacia* y otras [28, 185, 318, 407, 408, 428, 479].

Nuevas estrategias para superar la barrera de la membrana externa

El uso de la mayoría de los β-lactámicos utilizados hoy está enfocado a los mecanismos de resistencia por β-lactamasas; por ello se administran conjuntamente un β-lactámico y un inhibidor de las β-lactamasas. Desgraciadamente las bacterias han mutado para eludir e inactivar tanto a los nuevos β-lactámicos enzima-resistentes como a los inhibidores de las β-lactamasas, rediseñando estas enzimas a través de sutiles mutaciones en los residuos de los aminoácidos que rodean el sitio activo.

Como la existencia de una barrera de permeabilidad en la membrana externa es un factor de gran importancia en la reducción de la efectividad del tratamiento antimicrobiano, una estrategia para disminuir la resistencia debida a la membrana involucraría la administración conjunta de un compuesto diseñado para romper esta barrera y un antimicrobiano. Este tipo de estrategia se ha estado utilizando con permeabilizadores de la membrana externa como el EDTA, la polimixina B o el ascorbato [191, 349, 469].

Incidencia clínica de la impermeabilidad de la membrana externa

La incidencia clínica de la impermeabilidad de la membrana externa es difícil de valorar, puesto que no siempre es detectada y las observaciones raramente son dadas a conocer. En el siguiente cuadro se exponen las principales especies bacterianas conjuntamente con las resistencias más importantes producidas.

Tabla 16.- CONSECUENCIA DE LA ALTERACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA (OMP) DE DIFERENTES BACTERIAS GRAMNEGATIVAS* SOBRE LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS [7, 8, 18, 47, 95, 96, 99, 135, 168, 204, 232, 233, 258, 259, 294, 296, 306, 307, 323, 329, 349, 357, 384, 385, 428]

Especie bacteriana	**Mutación**	**Sensibilidad disminuida a:**
Escherichia coli	⇓ OmpF	Carbenicilina, Ticarcilina, Cefoxitina, Moxalactam, Cloranfenicol, Tetraciclina, Norfloxacina
	mar	Ampicilina, Cefalotina, Cloranfenicol, Tetraciclina, Ácido Nalidíxico, Ciprofloxacina, Norfloxacina, Rifampicina.
Klebsiella pneumoniae	⇓ OmpK 35	Cefoxitina, Cefotaxima, Cloranfenicol, Tetraciclina, Ácido nalidíxico, Ciprofloxacina, Norfloxacina, Trimetoprim
Enterobacter cloacae	⇓ OmpF y D	Cefoxitina, Moxalactam, Imipenem, Cloranfenicol, Trimetoprim
Citrobacter freundii	⇓ Omp	Cefoxitina, Cloranfenicol, Tetraciclina, Ácido nalidíxico, Norfloxacina, Trimetoprim
Proteus vulgaris	⇓ Omp	Cefoxitina, Cloranfenicol, Tetraciclina, Ácido nalidíxico, Norfloxacina, Trimetoprim
Salmonella paratyphi A y Salmonella typhimurium	⇓ Omp	Cefoxitina, Moxalactam, Imipenem, Cloranfenicol, Trimetoprim

* Especies bacterianas utilizadas en este estudio.

3 Mecanismos de Resistencia a los Antimicrobianos

1 - Introducción.

2 - Tipos de resistencia.
- 2.A - Resistencias Cromosómicas: Mutación
- 2.B - Resistencias Extracromosómicas
  - 2.B.1 - Transformación.
  - 2.B.2 - Transducción.
  - 2.B.3 - Conjugación.

3 - Principales mecanismos de resistencia.
- 3.A - Alteraciones en la permeabilidad, captación y acumulación.
- 3.B - Mecanismos enzimáticos de inactivación.
- 3.C - Cambios en los puntos de acción o falta de la diana.

1 - Introducción

Se denomina resistencia a la disminución de la susceptibilidad de una cepa bacteriana a un antimicrobiano; es decir, clínicamente, su crecimiento sólo podría inhibirse con concentraciones superiores a la que se puede alcanzar en el lugar de la infección con ese fármaco.

Las cepas resistentes se hacen predominantes gracias a la presión selectiva de los antimicrobianos que eliminan a las bacterias sensibles. En su aparición y selección están implicados los antimicrobianos usados tanto en medicina humana como en veterinaria, ya sea con fines terapéuticos, profilácticos o de engorde. Su abuso incide tanto sobre las bacterias patógenas como sobre las oportunistas y las no patógenas.

Las bacterias sometidas a esta presión antimicrobiana desarrollan mutaciones que le confieren mecanismos de resistencia debidos al desarrollo de enzimas de su propio metabolismo, o por adquisición de genes de resistencia por transformación, transducción o conjugación.

La resistencia es uno de los factores responsables de los cambios en los agentes etiológicos que han existido en las infecciones, especialmente a nivel nosocomial, tras las introducción de la terapia antimicrobiana. En la actualidad es el mayor problema de la quimioterapia antimicrobiana debido a la aparición del fenómeno de multirresistencia.

2 - TIPOS DE RESISTENCIA

Puede ser debido a factores ambientales o deberse a causas dependientes del microorganismo.

La **resistencia fenotípica** (*resistencia ambiental*) es la debida a factores físico-químicos que pueden determinar que un antimicrobiano sea inactivo frente a una bacteria.

La **resistencia genotípica** es la más importante y se debe a causas exclusivamente del microorganismo; entre ellas podemos distinguir dos tipos:

La **resistencia natural o intrínseca** o insensibilidad natural, y es la que presentan algunas bacterias de forma preestablecida por no existir una diana adecuada para ese antimicrobiano.

La **resistencia adquirida** es la que surge a lo largo del tiempo y es la debida a modificaciones en la carga genética de la bacteria y que puede aparecer tanto por mutación cromosómica como por fenómenos de transferencia genética, ambos mediados por plásmidos, transposones o integrones [110, 317].

Genéticamente la resistencia bacteriana a los antimicrobianos puede resultar de la alteración de la información genética endógena (mutación) o de la adquisición de información genética exógena (plásmidos o transposones).

Los plásmidos son moléculas de ADN bicatenario circular, extracromosómicos, dotados generalmente de replicación autónoma y que son transmisibles de forma estable en el curso de las generaciones. Su principal característica es su capacidad de replicación autónoma.

En general, los plásmidos de los organismos procariotas no son indispensables para la vida de la bacteria, pero contienen una gran variedad de caracteres. Los plásmidos R o factores R son importantes en la patología infecciosa. Estos plásmidos confieren resistencia a antimicrobianos de familias diferentes. Asimismo es frecuente el caso de plásmidos diferentes que coexisten en la misma bacteria, lo cual añadido a la resistencia intrínseca determina la aparición de cepas resistentes a múltiples antimicrobianos.

Los **transposones** son segmentos de ADN, cuyo tamaño varía de 2,5 a 20 kb, que tienen la propiedad de moverse entre los replicones bacterianos, desde una posición a otra en el genoma. No se autorreplican, están presentes en los plásmidos o en el cromosoma bacteriano y poseen la capacidad de poder abandonar esta localización inicial e insertarse en un nuevo plásmido o en un nuevo ADN cromosómico. De esta forma, puede realizarse la transferencia de material genético "saltando" de un plásmido a otro, de ADN cromosómico a un plásmido, de un plásmido a un bacteriófago, etc., en resumen de un replicón a otro. Esta forma de transferencia de la información genética recibe el nombre de transposición. Se conocen muchos transposones y recientemente, se ha comprobado que algunos de ellos pueden pasar del cromosoma de una bacteria a otra, sin ir vehiculados por un bacteriófago o plásmido. Este tipo de transposones se han descrito en bacterias grampositivas y se les llama transposones conjugativos [271, 333].

2.A - RESISTENCIAS CROMOSÓMICAS: MUTACIÓN

Una mutación es cualquier cambio de bases en el ADN. Se da en muy pocos individuos de la población y es letal o hereditaria, ocurre

de forma espontánea, es persistente y puede ser inducida por agentes (mutágenos) físicos, como la luz UV o los rayos X, o por mutágenos químicos [149].

Las mutaciones espontáneas suelen tener un índice bajo de aparición, del orden de un individuo por cada 10^8. La selección de estos mutantes puede realizarse *in vitro* sometiendo a una población inicial, formada por un número elevado de células sensibles y otro discreto de mutantes resistentes, a la acción de un quimioterápico a una concentración determinada.
Bajo estas circunstancias, las células sensibles quedarán inhibidas o morirán, mientras que las resistentes a esa concentración sobrevivirán y se multiplicarán libremente, dando lugar a una población resistente; esta puede ser homogénea, si todas ellas tienen el mismo grado de resistencia, o heterogénea si está formada por clones con distintos grados de la misma.

Normalmente las resistencias iniciales son de bajo grado, denominándose mutantes primarias; si estas se enfrentan a concentraciones progresivamente elevadas del antimicrobiano se seleccionarán mutantes secundarios y si se continúa así el proceso se alcanzará un nivel de resistencia máximo.
Si en el primer paso se obtiene la máxima resistencia posible, se dice que la resistencia es del tipo "de un escalón", en cambio en el segundo caso, en que se necesitan varias generaciones enfrentadas cada vez a un nivel creciente de antimicrobiano, se dice que la resistencia es del tipo "de múltiples escalones".
In vivo, la dinámica de la resistencia sigue el mismo camino [110, 317].

Las **formas de expresión de las resistencias cromosómicas** en una mutación pueden ser de varios tipos:

1. Conversión de un antimicrobiano en una sustancia inactiva mediante la acción de una enzima. (Ejem.: β-lactamasas)
2. Mutación y subsiguiente modificación el gen donde actúa el antimicrobiano (sitios diana).
3. Producción incrementada de la enzima que es bloqueada por el antimicrobiano.
4. Disminución de la permeabilidad celular al antimicrobiano.
5. Aumento de un metabolito que antagoniza al antimicrobiano.
6. Incremento o creación de una nueva vía metabólica para prescindir del producto interceptado por el antimicrobiano.

Una característica de todo mutante es que la mayoría de ellos pueden revertir a la condición de la cepa salvaje original mediante una mutación inversa. Este retorno es un retorno al fenotipo, pero no necesariamente al genotipo original ya que el efecto de la primera mutación puede ser suprimido mediante una segunda mutación en un sitio diferente del cromosoma [110].

2.B - RESISTENCIAS EXTRACROMOSÓMICAS

Las bacterias también pueden hacerse resistentes a los antimicrobianos mediante transferencias de material genético. Estas pueden tener lugar mediante los siguientes mecanismos:

2.B.1. Transformación.
2.B.2. Transducción.
2.B.3. Conjugación (factores R).

2.B.1. Transformación

La transformación es el mecanismo de transferencia genética mediante el cual, el material genético externo a la bacteria puede ser

captado por ésta e incluido de forma estable en el genoma bacteriano. La mayoría de las especies bacterianas no son transformables de forma natural (se dice que no son "competentes"). Las que no lo son de manera natural es necesario someterlas a un proceso para hacerlas "competentes".
La diferencia esencial estriba en que mientras en la transformación natural se transfiere sólo una cadena simple del ADN, en la transformación de forma "artificial" se transfiere el ADN con su doble cadena intacta. Ésta es una técnica muy útil para transferir los plásmidos no conjugativos y no movilizables [317].

2.B.2. Transducción

La transducción es una transferencia genética mediada por bateriófagos. Los bacteriófagos son virus parásitos de la bacterias. El material genético es transducido por un bacteriófago que se multiplica, inicialmente, sobre las bacterias donadoras y, posteriormente, se incorpora al genoma de las receptoras, las cuales, habitualmente, constituyen una pequeña proporción del total de la población infectada y reciben el nombre de transductantes.
Los fagos bacterianos pueden tener dos ciclos: el primero llamado virulento o lítico en el cual éstos se multiplican dentro de la bacteria y la obligan a fabricar bacteriófagos que la lisan, invadiendo otras células al salir al exterior; el segundo ciclo recibe el nombre de lisogénico y el fago temperado; se caracteriza porque éste, una vez que ha penetrado en la bacteria, se incorpora en un *locus* cromosómico de la misma, constituyéndose en profago, y se reproduce, indefinidamente, con el genoma bacteriano; en este caso la bacteria recibe el nombre de lisógena. Algunos de estos fagos llevan parte del material genético de la donadora y si éste corresponde a un *locus* cromosómico de resistencia a uno o más antimicrobianos, el bacteriófago, al invadir una nueva bacteria puede pasar al estado de profago, volviéndola resistente. Este fenómeno es el único que ha podido explicar, hasta ahora, la presencia de partículas contagiosas en cepas en las que no se han demostrado otros mecanismos de transferencia, tal como ocurre con el estafilococo [317, 333].

2.B.3. Conjugación

La conjugación es el tercer mecanismo de transferencia del material genético de una célula bacteriana a otra. Mientras que en la transducción y en la transformación sólo se transfieren fragmentos muy pequeños del cromosoma bacteriano, en la conjugación pueden transferirse grandes segmentos del cromosoma o incluso el cromosoma entero. Depende de un contacto físico entre las células mediante *pili*, siendo el intercambio de material genético unidireccional, con transferencia de la información genética de la células macho a las hembra.

Este proceso está usualmente codificado por plásmidos conjugativos, que pueden aislarse en gran número de bacterias gramnegativas y que incluyen miembros de más de 20 grupos de incompatibilidad. Todos los plásmidos que pertenecen a distintos grupos de incompatibilidad muestran escasa homología de su ADN.

Resistencia mediada por plásmidos, transposones e integrones. Factores R

El factor transferible de resistencia fue denominado factor R. Todos los estudios realizados hasta ahora indican que es una doble banda circular de ADN que se autorreplica independientemente del cromosoma. Puede incorporar genes cromosómicos e, incluso, conjugarse con dicho factor, con el que pasaría unido; también es posible su unión con un

factor colicinogénico.

La transmisión del factor R se realiza de forma directa bacteria a bacteria y parece, cada vez más evidente, que tiene lugar a través de un pilus o puente hueco establecido entre ambas por donde, en pocos segundos, pasa una de las dos bandas del ADN, la cual, posteriormente, reconstituirá el factor completo en la receptora que lo transmitirá a sus descendientes. En ocasiones, no es transferible y solamente se perpetúa en la estirpe que lo porta, replicándose sincrónicamente o no con el cromosoma.
A este tipo de plásmidos se les da el nombre de plásmidos R (plásmido de resistencia) o factor R.
La transmisión de plásmidos por transducción es menos importante que la transmisión por conjugación. Sin embargo, es un fenómeno que se ha observado en un número importante de bacterias. Es un mecanismo de recombinación genética realizado mediante un fago bacteriano, el cual pasa ADN cromosómico o plasmídico de una bacteria a otra [110, 333].

Los **transposones** encontrados en bacterias se pueden dividir en tres clases: secuencias de inserción, transposones complejos y transposones asociados con fagos.

Las secuencias de inserción (SI) son los transposones más simples. Su longitud oscila entre 150 y 1.500 pares de bases y poseen repeticiones invertidas de 15 a 40 pares en sus extremos. Los elementos SI son constituyentes normales de los cromosomas bacterianos y se pueden integrar en plásmidos y genomas de fagos. Los SI sólo transportan la información genética necesaria para su propia transferencia (es decir, el gen que codifica la transposasa). Es posible detectarlos si su inserción conduce a interrupción o inactivación de genes, o si modifican la expresión de genes adyacentes.

Los transposones complejos incluyen al grupo de plásmidos de conjugación conocidos como factores R y que codifican genes de resistencia a antimicrobianos. Los plásmidos R se componen de dos partes funcionalmente distintas: el factor de transferencia de resistencia y el transposón que contiene los genes para varias clases de resistencias a los fármacos. Esos plásmidos constituyen la causa más común de resistencia activa a los antimicrobianos en las bacterias causantes de infecciones.

Los transposones asociados con fagos o fagos transpositivos como el Mu y el D108 son otro tipo de transposones, que usan la transposición como modo de reproducción normal.

El término **integrón** se utilizó originalmente para describir un grupo de elementos aparentemente móviles que contenían uno o más genes de resistencia a antimicrobianos localizados en un lugar específico. Los integrones son elementos genéticos integrados que funcionan, de forma esporádica, como unidades recombinantes en un lugar especifico de la replicación, en las largas secuencias no homologas de ADN. Se han puesto de manifiesto por análisis genéticos de las secuencias de ADN contiguo a los genes de resistencia (cromosómico o plasmídico).
La trascendencia de los factores R y de los plásmidos de resistencia estriba en que la mayor parte de las cepas de origen clínico, sobre todo hospitalarias, deben su resistencia a aquéllos [271, 317, 333].

3 - PRINCIPALES MECANISMOS DE RESISTENCIA

La resistencia bacteriana aparece básicamente por tres mecanismos, que pueden intervenir de forma aislada o asociados (tabla 17).
El primero consiste en la disminución de la *acumulación* del antimicrobiano en el interior de la célula, que puede ser debido a una disminución de la *permeabilidad* o a un incremento de la *expulsión activa*.
El segundo se basa en la *inactivación enzimática* por hidrólisis (como en los β-lactámicos) o por detoxificación como en los aminoglucósidos.
El tercero engloba los cambios en los puntos de acción o *lugares diana* (proteínas fijadoras de penicilinas o PFPs, ribosomas, cadenas metabólicas, enzimas, etc.) [149].

TABLA 17.- **PRINCIPALES MECANISMOS DE RESISTENCIA [149]**

Alteración en el lugar de acción	• β-lactámicos • Estreptomicina • Eritromicina • Clindamicina • Quinolonas • Rifampicina • Sulfonamidas • Tetraciclina • Trimetoprima
Mecanismos enzimáticos de inactivación	• β-lactámicos • Aminoglucósidos • Cloranfenicol
Alteración de la permeabilidad, captación y concentración	• β-lactámicos • Cloranfenicol • Quinolonas • Tetraciclina • Trimetoprima • Eritromicina

3.A - ALTERACIÓN EN LA PERMEABILIDAD, CAPTACIÓN O ACUMULACIÓN

En ocasiones los antimicrobianos no son capaces de penetrar en el interior de la bacteria, o lo hacen en concentraciones muy pequeñas. Esto puede ser debido a una incapacidad para salvar el obstáculo que representa la membrana externa debida a la hidrofobicidad del antimicrobiano o a una disminución o modificación de las porinas por mutación o fenómenos de transferencia genética [69, 70, 71, 282, 283, 315].

A veces, la resistencia puede surgir cuando un antimicrobiano, como la tetraciclina, una vez que ha penetrado en el interior de las bacterias, vuelve a salir en su mayor parte y no se acumula en el interior celular en cantidad suficiente para unirse de manera eficaz al sitio de acción. Este mecanismo es conocido como expulsión activa del antimicrobiano.

3.B - MECANISMOS ENZIMÁTICOS DE INACTIVACIÓN

Diversas enzimas pueden modificar los antimicrobianos catalizando su destrucción o convirtiéndolos en derivados inactivos. Es la principal forma de resistencia a los antimicrobianos más utilizados en clínica como β-lactámicos y aminoglucósidos.
Las β-lactamasas son enzimas que hidrolizan el antibiótico, inactivándolo por actuar sobre el enlace amida en el anillo β-lactámico. Estas enzimas, desde el punto de vista bioquímico, se distinguen por su actividad dirigida preferente frente a penicilinas (penicilinasas), cefalosporinas (cefalosporinasas) o por un amplio espectro (ambas). Desde el punto de vista genético pueden ser cromosómicas o plasmídicas. También pueden ser inducibles

o constitutivas, es decir, sintetizadas en presencia o en ausencia de un inductor. Se han efectuado numerosas clasificaciones siendo las dos más utilizadas, la de Richmond y Sykes; y la de Bush, Jacoby y Medeiros (tablas 20, 21, 22). Estas enzimas son producidas principalmente por estafilococos, enterobacterias, *P. aeruginosa, Neisseria gonorrhoeae, Moraxella catarrhalis, Haemophillus influenzae* y algunas bacterias anaerobias, pero otras muchas bacterias son capaces de producirlas [69, 70, 71, 282, 283, 315].

En estafilococos, las β-lactamasas son plasmídicas, inducibles y generalmente extracelulares.

En las bacterias gramnegativas, la mayor parte son de origen plasmídico o codificadas por transposones, casi siempre constitutivas y se encuentran en el espacio periplásmico; aunque también podemos encontrar β-lactamasas cromosómicas, tanto inducibles como constitutivas.

Los aminoglucósidos por modificaciones enzimáticas pierden afinidad por el ribosoma. Estos enzimas son codificados por genes plasmídicos o cromosómicos, se localizan intracelularmente, son de tipo constitutivo y en algunos casos son vehiculados por transposones.

El cloranfenicol pierde afinidad por el ribosoma debido a la presencia de una cloranfenicol-acetiltransferasa que se localiza intracelularmente. Generalmente está codificada por plásmidos, suele ser inducible en las bacterias grampositivas y de tipo constitutivo en las gramnegativas.

Otros antimicrobianos como macrólidos y tetraciclinas pueden ser inactivados por modificaciones enzimáticas, aunque generalmente éste no es el principal mecanismo de resistencia [149].

3.C - CAMBIOS EN LOS PUNTOS DE ACCIÓN O FALTA DE LA DIANA

La resistencia a los antimicrobianos β-lactámicos pueden surgir por alteraciones en las proteínas fijadoras de penicilinas (PFPs) que muestran una menor afinidad por el antimicrobiano (gonococo), por síntesis de nuevas PFPs sin modificarse la afinidad de las originales *(Enterococcus faecium)* o por una combinación de las anteriores mecanismos (neumococos). Las alteraciones de las PFPs son adquiridas y casi siempre se deben a mutaciones cromosómicas.

La resistencia por alteraciones en los ribosomas pueden surgir por mutación (resistencia de enterococos a estreptomicina) o por la acción de enzimas codificados en el cromosoma, plásmidos o transposones (macrólidos, lincosamidas y estreptograminas). Las alteraciones a nivel de la subunidad A de la girasa del ADN es el principal mecanismo de resistencia de las fluoroquinolonas.

Existen mecanismos en los que se altera el lugar de acción de los antimicrobianos por hiperproducción de sustratos competitivos o enzimas diana como sulfamidas y trimetoprima por una hiperproducción de PABA y dihidrofolatoreductasa respectivamente [69, 70, 71, 149, 282, 283, 315].

4 Clasificación y características de los β-Lactámicos

1 - Introducción.
- A - Historia.
- B - Estructura química.
- C - Farmacocinética.
- D - Mecanismo de acción. PFPs.

2 - Resistencia a β-lactámicos. β-lactamasas.
- A - Alteración de la permeabilidad.
- B - Cambios en las PFPs.
- C - Mecanismos enzimáticos de inactivación (β-lactamasas).
  - 1 - Localización de las β-lactamasas.
  - 2 - Producción de las β-lactamasas.
  - 3 - Codificación de las β-lactamasas.
  - 4 - Mecanismo de acción de las β-lactamasas.
  - 5 - Inhibición de las β-lactamasas.

3 - Penicilinas o penamas.
- A - Estructura química.
- B - Clasificación.
- C - Modo de acción.

4 - Penemas y carbapenemas.
- A - Estructura química.
- B - Propiedades físico-químicas.
- C - Clasificación.
- D - Modo de acción.

5 - Monobactamas.
- A - Estructura química.
- B - Modo de acción.

6 - Cefalosporinas.
- A - Estructura química.
- B - Propiedades físico-químicas.
- C - Clasificación.
- D - Modo de acción.
- E - Farmacología.
- F - Espectro de actividad.
- G - Toxicidad y efectos secundarios.

7 - Inhibidores de las β-lactamasas.
- A - Estructura química.
- B - Propiedades físico-químicas.
- C - Clasificación.
- D - Modo de acción.

1 - INTRODUCCIÓN

1.A - HISTORIA

El descubrimiento casual en 1929 y el aislamiento posterior en 1940 de la penicilina pura y su preparación a escala industrial permitió la biosíntesis de varias penicilinas al descubrirse que podía obtenerse en los caldos de fermentación, exclusivamente penicilina G, añadiendo al medio de cultivo, ácido fenilacético.

Las penicilinas semisintéticas fueron primeramente preparadas por modificación química del grupo para-amino de la penicilina G hasta el aislamiento natural del núcleo de la penicilina, es decir, el ácido 6-amino penicilánico (6-APA) en 1959.

El aislamiento del ácido penicilánico fue el punto de partida para la preparación de nuevas penicilinas por la adición de distintas cadenas laterales, estructuradas por síntesis química y agregadas al grupo NH_2 del 6-APA por medio de sus correspondientes cloruros de ácido.

Diversos objetivos se persiguieron al mismo tiempo, uno de ellos era ampliar el espectro para abarcar tanto bacilos grampositivos como bacilos gramnegativos; otra posibilidad fue la elección de cadenas laterales que hicieran a la penicilina resistente a las enzimas penicilinásicas.

Del descubrimiento de una actividad antibiótica en caldos de cultivo de hongos del género *Cephalosporium* aislados por Brotzu en 1945 y de estudios y aislamientos posteriores, se aisló en 1955 la que fue denominada cefalosporina C. De esta cefalosporina C se derivan las cefalosporinas semisintéticas elaboradas por un mecanismo similar al de las penicilinas semisintéticas.

En 1972 se describió un nuevo grupo o familia de sustancias antibióticas que, aunque está íntimamente relacionada con la de las cefalosporinas, constituye una entidad distinta: las cefamicinas.

Posteriormente aparecen otros grupos de antimicrobianos con diversas actividades. En conjunto, los antibióticos β-lactámicos podemos clasificarlos en varios grupos:

Penicilinas o Penamas
Penemas y Carbapenemas
Cefalosporinas o Cefemas y Oxacefemas
Monobactamas
Inhibidores de las β-lactamasas:
 Clavamas y otros.

1.B - ESTRUCTURA QUÍMICA

El núcleo fundamental de los β-lactámicos es el anillo de β-lactama de cuatro átomos que, salvo en el caso de las monobactamas, se encuentra condensado junto a otro tiazolidínico o dihidrotiazínico. Las estructuras generales se exponen en la tabla 18.

TABLA 18.- ESTRUCTURAS BÁSICAS DE LOS β-LACTÁMICOS [2, 111]	
Penamas	Clavamas
Penemas	Carbapenemas
Cefamas	Cefemas
Oxacefemas	Monobactamas

1.C - FARMACOCINÉTICA

ABSORCIÓN.

Los antibióticos β-lactámicos se administran vía parenteral aunque algunos derivados tienen buena absorción vía oral.

DISTRIBUCIÓN.

Es en general buena, pero el grado de unión de los distintos antibióticos β-lactámicos a las proteínas plasmáticas varía notablemente de unos a otros. Hay que tener en cuenta que los antibióticos β-lactámicos son sustancias hidrófilas y, por tanto, tendrán un bajo grado de unión a las proteínas plasmáticas y presentarán una alta difusión a través de los tejidos.
Por otra parte, en condiciones normales, no son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica; sin embargo en los casos en que existe inflamación de las meninges, esta difusión está aumentada, haciendo posible el uso de estos antibióticos en el tratamiento de infecciones ocasionadas en esta zona.
Todos los antibióticos β-lactámicos atraviesan la barrera placentaria llegando a la circulación fetal. A pesar de ello, y debido a su escasa toxicidad, son de elección para el tratamiento de infecciones durante el embarazo.

METABOLISMO

Generalmente sufren poca metabolización y ésta suele ser hepática, renal o intestinal, mediante oxidaciones, reducciones, conjugaciones e hidrólisis.
En el caso concreto del metabolismo del imipenem, es importante destacar la acción de una dipeptidasa renal, localizada en las células del túbulo proximal renal, que lo hidroliza haciendo que pase a la orina en forma de metabolito inactivo. La administración simultánea de un inhibidor de esta dipeptidasa, la cilastatina, aumenta la presencia urinaria del imipenem sin metabolizar hasta un 70%.

EXCRECIÓN

En su mayor parte se eliminan de forma activa e inalterados. La mayoría son eliminados por vía renal, aunque algunos lo hacen por vía biliar, continuando por vía intestinal y siendo en parte eliminados con las heces y en parte reabsorbidos en un ciclo enterohepático. Otros pueden eliminarse parcialmente por la leche, la saliva o el sudor.
Algunas cefalosporinas tienen como vía de eliminación más importante la vía biliar, tal es el caso de la ceftriaxona, cefotetam y sobre todo cefoperazona, lo que supone que serán efectivas para el tratamiento de las infecciones localizadas a nivel de vías biliares, pero al existir una circulación intestinal del antibiótico también pueden dar lugar a efectos adversos como modificación de la flora intestinal y alteraciones en la coagulación por hipoprotrombinemia secundaria al déficit de vitamina K derivado de dicha reducción de la flora intestinal [2, 111].

1.D - MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS β-LACTÁMICOS. EL PAPEL DE LAS PROTEÍNAS FIJADORAS DE PENICILINA O PFPS

Las penicilinas, y en general todas las betalactaminas, inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana de los microorganismos sensibles al impedir la biosíntesis de mureína o peptidoglicano, por competición con las enzimas transpeptidasas y carboxipeptidasas encargadas de la formación de los puentes de pentaglicina responsables de la unión de las cadenas lineales de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico. La acción es de tipo bactericida y sólo se ejerce sobre las bacterias sensibles que se encuentren en fase de

crecimiento.
Estas enzimas son sensibles a las penicilinas y están presentes en la membrana citoplásmica. Las transpeptidasas y carboxipeptidasas que reconocen como sustratos a las penicilinas, cefalosporinas y cefamicinas son denominadas enzimas o proteínas fijadoras de penicilina (PFPs). Hasta el momento, se han descrito varias PFPs localizadas en la membrana interna de la pared celular o en la membrana citoplásmica y que se denominan: 1a, 1b, 2, 2a, 2b, 2x, 3, 3', 4, 4', 5, 6, 7, 7a, 7b, 8, y 9. La unión de los antibióticos β-lactámicos con estas proteínas tiene efectos diversos y característicos sobre la morfología y la viabilidad bacteriana [13, 166, 186, 280, 282, 284, 300, 426].

El complejo PFP 1 (1a y 1b) es el más importante, ya que estas enzimas están relacionadas con la biosíntesis del peptidoglicano íntimamente ligado a la elongación de la bacteria, por lo que su inhibición y el bloqueo de su acción fisiológica, determinada por su fijación a una penicilina o a una cefema, trae consigo la detención del crecimiento bacteriano y puede llevar a la formación de esferoplastos o protoplastos y posterior lisis, si no se encuentran en un ambiente hipertónico, por la acción incontrolada de otras enzimas denominadas endopeptidasas o mucopeptidasas que tienen efecto autolítico [111, 166, 186, 280].
La PFP 2 actúa en el mantenimiento de la forma de la bacteria y se denomina factor de conformación, pues actúa añadiendo bloques curvos de peptidoglicano a las "esquinas" de los bacilos; su inhibición por fijación a una penicilina, una cefalosporina o una cefamicina origina formas esféricas u ovoides gigantes [111, 166, 186, 280]. Asimismo en *E. coli* se ha implicado en la inducción de la síntesis de β-lactamasas del tipo AmpC [44, 52, 56].
La PFP 3, que es esencial para la división celular, es llamada factor de segmentación, pues su papel consiste en formar septos o paredes transversales para dividir la bacteria en dos; el bloqueo de su acción por penicilinas o cefemas da lugar al alargamiento incontrolado del microorganismo, con la formación de células filamentosas [111, 166, 186, 280].

El resto de las PFPs no parecen ser indispensables para la formación de la pared celular, puesto que se han encontrado mutantes de *Escherichia coli* que carecen de ellas sin que presenten ninguna anomalía en la síntesis de su pared [111, 166, 186, 280]. Por su parte, tanto en *P. aeruginosa* como en *E. cloacae* el nivel inducido de expresión de β-lactamasas cromosómicas se correlaciona con el grado de unión del inductor a PFP5 y PFP7 [44, 426], pero no con otras PFPs, aunque el papel de la PFP8 y PFP9 en el proceso de inducción de β-lactamasas aún no ha sido estudiado.

Además de las transpeptidasas y las carboxipeptidasas existen otras enzimas, las endopeptidasas o mucopeptidasas; estos tres tipos de enzimas intervienen en los estadios finales de la síntesis del peptidoglicano de la pared celular de la bacteria. Las endopeptidasas o mucopeptidasas son enzimas autolíticas, que en condiciones fisiológicas actúan conjuntamente con los otros dos tipos, pero cuando las transpeptidasas o las carboxipeptidasas son bloqueadas al unirse a penicilinas, cefalosporinas y cefamicinas, las endopeptidasas funcionan libremente, de forma descontrolada, y dan lugar a la lisis bacteriana, por lo que, en último término, la acción bactericida de estos antibióticos es el resultado del efecto de dichas enzimas [111, 166, 186, 280].

2 - RESISTENCIA A β-LACTÁMICOS

Los microorganismos con una pared celular inexistente o deficiente, como *Mycoptasrna* o formas L bacterianas o las que estén en fase estacionaria, presentan resistencia natural a los β-lactámicos. Estos antibióticos son los más utilizados en clínica por lo que el desarrollo de resistencias representa un importante problema. Se han identificado tres mecanismos independientes, que a veces pueden actuar sinérgicamente.

2.A - ALTERACIÓN DE LA PERMEABILIDAD

Para llegar a los sitios de actuación los antibióticos deberán atravesar las envolturas más externas de la bacteria. En el caso de los antibióticos β-lactámicos, el sitio diana, las PFPs, están situadas en la cara externa de la membrana citoplasmática.

Este mecanismo es frecuente en bacterias gramnegativas, las características estructurales de la pared impiden una penetración eficaz del antibiótico. La entrada de los β-lactámicos tiene lugar de forma pasiva a través de las porinas. En este tipo de bacterias, los antibióticos β-lactámicos, dada su naturaleza hidrófila, no pueden atravesar esta barrera a través de la bicapa lipídica por difusión y penetran fundamentalmente a través de canales constituidos por porinas. En las bacterias grampositivas esta penetración es fácil gracias a que sólo poseen la envoltura externa glucopéptida. Por ello, esta barrera de permeabilidad protege a la bacteria gramnegativa si existen otros mecanismos que eliminen los antibióticos del espacio o gel periplásmico. La modificación o desaparición de las porinas en bacterias gramnegativas alteran la permeabilidad y pueden ser una causa de resistencia o un factor que contribuya a la misma. Estas alteraciones pueden deberse a mutaciones que disminuyen la síntesis de porinas.

En *Escherichia coli*, y en gramnegativos en general, las porinas OmpF y OmpC son las más importantes. Cuando están disminuidas ambas son hasta 32 veces más resistentes a la mayoría de las cefalosporinas, cuando carecen de OmpF y están aumentadas las OmpC la resistencia es variable, y cuando no poseen OmpC no está afectada la sensibilidad [69, 70, 71, 282, 283, 315].

Se han descrito numerosos mutantes deficientes en la porina F y/o en la porina C de *Escherichia coli*. La deficiencia en la porina F es la que tiene un mayor efecto en la permeabilidad de la pared bacteriana a las moléculas de los antibióticos β-lactámicos [131]. También la porina C permite el paso de muchas moléculas de β-lactámicos, entre otras muchas moléculas, aunque para la misma molécula el grado de difusión a través de la porina C es mucho menor que a través de la porina F [131]. Por ejemplo, el grado de difusión de cefoxitina y de cefotaxima es el doble a través de la porina F que a través de la porina C [131]. La deficiencia en la porina F, y mucho menos la deficiencia de la porina C, es un factor que frecuentemente contribuye a determinar altos niveles de resistencia a antimicrobianos, y en concreto a antibióticos β-lactámicos en cepas de *E. coli* tanto de procedencia clínica como seleccionadas *in vitro* [96, 329, 345]. También es frecuente en cepas de otras especies de enterobacterias la pérdida de la porina F y de la porina D como ocurre en *E. cloacae* [4, 84, 99, 109, 270, 347, 373, 398, 484], la pérdida de una proteína 40-41 kDa en *E. aerogenes* [90], *C. freundii* [294], la falta de OpmK36 en *Klebsiella*

pneumoniae [306], la deficiencia de la porina F en *Salmonella* sp. [109, 316] y otras.
Otro hecho a destacar es que generalmente estos cambios en la permeabilidad forman parte de un conjunto de mutaciones que se manifiestan en mutantes con fenotipos de resistencia a múltiples antimicrobianos. Este es el caso de las cepas de *E. coli* en las que la activación del gen *marA* resulta en el déficit de expresión de la porina F [8, 89, 96, 97, 180, 221, 298, 321, 355]. El mismo resultado se aprecia en cepas mutantes de otras especies de enterobacterias en las que la activación de genes homólogos de *marA* crea defectos en la permeabilidad por pérdida de expresión de porinas de su membrana externa [8, 164, 232, 258, 259, 269].

Según diferentes estudios, para producir un incremento significativo en la CMI de un determinado antibiótico que tenía buena penetración en cepas no mutantes, se necesitaron disminuciones de 100 veces o más en los coeficientes de permeabilidad [344]. Sin embargo, el efecto de una permeabilidad deficiente en la célula bacteriana favorece tanto al efecto hidrolítico como al inactivador de las β-lactamasas causado sobre las moléculas de antibiótico que penetren en la célula bacteriana y, por tanto, actúa como mecanismo complementario potenciando el efecto de las β-lactamasas existentes en la célula bacteriana [4, 84, 99, 131, 239, 294, 345, 347, 373, 405, 467, 484].

En *Pseudomonas aeruginosa* la mayor parte de los aislamientos resistentes a carbenicilina, permanecen sensibles a imipenem pero poseen un elevado nivel de resistencia a tetraciclina y cloranfenicol y tienen alterado su patrón de sensibilidad al resto de los β-lactámicos y quinolonas. La actividad a imipenem se mantiene ya que la entrada de este antimicrobiano se realiza por una vía diferente a los demás (porina D2). Debido a la desaparición de esta porina se produce resistencia a imipenem. [149]. En *P. aeruginosa* resistentes al imipenem, diversos trabajos muestran que la disminución de la permeabilidad por la pérdida de la porina OprD es la principal causa de dicha resistencia, aunque también en otros se describe el papel de la disminución de la afinidad de ciertas PFPs [86, 87, 282, 489].

Por sus características moleculares unos β-lactámicos penetran mejor que otros, así, el imipenem y el moxalactam, por su hidrofilia penetran muy bien. Las cefalosporinas de la 1ª generación penetran bien a través de la membrana externa pero son débiles frente a la acción de las β-lactamasas. Las cefalosporinas de 3ª generación presentan radicales que les confieren nuevas propiedades antibacterianas, pero que aumentan el volumen de la molécula y atraviesan lentamente la membrana externa; éste es el caso de la ceftazidima, cuyo flujo a través de la membrana es inferior que el de las cefalosporinas de 1ª generación [69, 70, 71, 282, 283, 315].

2.B - CAMBIOS O AUSENCIA DE LOS SITIOS DE ACCIÓN (PFPS) O DIANA.

Las funciones enzimáticas de las proteínas fijadoras de penicilinas (PFPs) son esenciales en la síntesis del peptidoglicano de la pared celular. A este nivel, los β-lactámicos ejercen su efecto bactericida mediante la inhibición de estas PFPs actuando como análogos de un componente del peptidoglicano, la acil-D-alanilD-alanina.
Los β-lactámicos se unen de forma irreversible a las PFPs de la membrana citoplasmática, originando una resistencia por alteraciones de las PFPs que puede deberse a 3 mecanismos:

1. Hiperproducción de una PFP resistente. Esta proteína se encuentra en muy pequeña

cantidad en la célula sensible; en estos casos puede llegar a sustituir a las PFPs inicialmente sensibles [282, 498].

2. Modificación de las PFPs por mutaciones puntuales, dando lugar a una disminución de la afinidad por los β-lactámicos. En estos casos, será necesario administrar una mayor cantidad de antibiótico con el fin de saturar las PFPs esenciales, esto se traduce en un aumento de la CMI inicial. Se ha descrito una disminución de la afinidad por β-lactámicos en *Streptococcus pneumoniae* (por las PFPs Ia, 2x, 2a y 2b), enterococos (PFP1 y 3), *N. gonorrhoeae* (PFP1 y 2), *P aeruginosa* (PFP3, aunque no es el mecanismo más importante), *H. influenzae* (PFP3, 4 y 5), etc. En *Bacteroides fragilis* la resistencia a cefoxitina se ha asociado con una baja afinidad de PFP1 y 2. La resistencia en *H. influenzae* y *N. gonorrhoeae*, con frecuencia, es debida a alteraciones de las PFPs asociadas a alteraciones de la permeabilidad.

3. Adquisición de una PFP resistente que reemplaza a una o varias PFPs sensibles. Este mecanismo de resistencia es más frecuente, por sus características estructurales, en bacterias grampositivas. La adquisición de este ADN exógeno que codifica una PFP resistente puede ser un gen completo o fragmentos de genes. La resistencia a meticilina de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* está determinada por la presencia de una *PFP* adicional (PFP2' ó PFP2a) [257, 282, 395, 426, 489, 498].

4. Hiperproducción de una PFP diana de un determinado antibiótico β-lactámico, que impediría la saturación de la diana del antibiótico β-lactámico dejando menor número de moléculas del antibiótico libres y activas [275].

- <u>IMPORTANCIA CLÍNICA DE LAS ALTERACIONES DE LAS PFPS EN ORGANISMOS GRAMNEGATIVOS</u>

Aunque en organismos gramnegativos el mecanismo más importante y frecuente es la inactivación por β-lactamasas, parece estar bastante probado que la modificación de las PFPs puede contribuir en la resistencia a los β-lactámicos, así como que la disminución de la permeabilidad de la membrana externa pueda dar lugar a una resistencia moderada a los antibióticos β-lactámicos. Se estima que cinco o seis *loci* cromosómicos regulan la resistencia intrínseca a los antibióticos β-lactámicos, debido a una disminución de las PFP-1 y PFP-2, reguladas probablemente por estos *loci*. Asimismo, parece probable que en las bacterias gramnegativas las mutaciones que afecten a una o más PFPs puedan estar asociadas a mutaciones que disminuyan la penetración del antibiótico a través de la membrana externa [257, 282, 395, 426, 489, 498].

Un estudio realizado en *Pseudomonas aeruginosa*, ha puesto de relieve que la alteración en la PFP-2 puede ser causa de resistencia al imipenem.
En tres cepas de *Haemophilus* resistentes a la ampicilina, β-lactamasas negativas, se ha encontrado que tenían alterada las PFPs 3+6, 3+4, ó 4 respectivamente. Además de esta alteración poseían una disminución de la permeabilidad de la membrana externa debida a una mutación de las proteínas de ésta.
Más recientemente se han obtenido cepas mutantes de *E. coli* resistentes a algunas cefalosporinas mediante la modificación de cuatro aminoácidos diferentes en la secuencia de la PFP-3 [257, 282, 395, 426, 489, 498].

2.C - MECANISMOS ENZIMÁTICOS DE INACTIVACIÓN (β-LACTAMASAS)

Los mecanismos enzimáticos por los cuales una bacteria resiste la acción de un antimicrobiano son:

I. Inactivación del antibiótico por una enzima producida por la bacteria. La hidrólisis del antibiótico depende de:
   a) La sensibilidad del antibiótico por la enzima.
   b) La cantidad de enzima elaborada por la bacteria.
   c) La afinidad del antibiótico por la enzima (número de moléculas de la enzima que se precisan para inactivar cada molécula de antibiótico).

II. Vía metabólica alternativa o inhibición competitiva de la enzima bacteriana que reconoce como sustrato al antimicrobiano.

La inactivación por enzimas elaboradas por las bacterias es el mecanismo más frecuente de resistencia a los antibióticos como los betalactámicos, aminoglucósidos y el cloranfenicol. Los β-lactámicos pueden ser inactivados por diferentes enzimas bacterianas como acilasas, amidasas y acetilesterasas. La producción de β-lactamasas es el mecanismo más importante de resistencia bacteriana frente a los β-lactámicos [149].

Las β-lactamasas son enzimas producidas por muchas bacterias grampositivas y gramnegativas, que actúan hidrolizando (inactivando) el anillo β-lactámico de los antibióticos que lo poseen. Como consecuencia directa de ello, el antibiótico pierde su actividad. Las β-lactamasas difieren en su perfil de sustratos (antibióticos a los que inactivan), su peso molecular, su punto isoeléctrico (son proteínas), su origen genético, su sensibilidad a diversos inhibidores y su actividad.
Su estructura química se corresponde con polipéptidos de una sola cadena con algo más de un centenar de aminoácidos y pequeño peso molecular. Bioquímicamente son peptidasas especializadas.

Los antibióticos β-lactámicos actúan interfiriendo la síntesis de la pared celular bacteriana, saturando e inactivando las proteínas fijadoras de penicilina (PFPs o PBPs: *Penicillin Binding Proteins*) de la membrana citoplasmática. Estas PFPs, son las proteínas diana para la acción de los β-lactámicos, y se corresponden con las transpeptidasas y carboxipeptidasas implicadas en la síntesis del peptidoglicano. Esta fijación se debe a la analogía entre el dipéptido de alanina y la molécula del antibiótico β-lactámico.

Originalmente, las β-lactamasas fueron el primer mecanismo de resistencia natural frente a los β-lactámicos siendo el caso de las cefalosporinasas en bacterias gramnegativas y de la resistencia adquirida con penicilinasas en *S. aureus*. El uso de antibióticos de amplio espectro como la ampicilina y las cefalosporinas, como la cefalotina, condujo a la aparición de penicilinasas mediadas por plásmidos en gramnegativas, tales como las TEM-1 [53, 54, 69, 70, 71, 128, 282, 283, 306, 307, 315, 334, 488, 494].

Con la llegada de los antibióticos β-lactámicos no-hidrolizables por las β-lactamasas y que actuaban como débiles inductores, han aparecido un nuevo tipo de resistencias, a partir de las especies bacterianas que presentaban β-lactamasas inducibles se produjo una selección de variantes que producen altos niveles de estas enzimas, de una forma constitutiva y que constituyen los mutantes desreprimidos. De manera que los patrones de susceptibilidad se modificaron con aparición de resistencias a los nuevos β-lactámicos incluyendo las cefalosporinas de tercera generación y monobactamos.
También ha aparecido una nueva modalidad de resistencia a los β-lactámicos no hidrolizables, tales como a las cefalosporinas de terce-

ra generación que son mediadas por β-lactamasas de amplio espectro, y de codificación plasmídica, identificadas sobre todo en especies de *Enterobacteriaceae* como *Klebsiella* spp. y *E. coli*. Una característica de estas enzimas es su actividad frente a un amplio espectro de los nuevos β-lactámicos [16, 70, 71, 73, 108, 114, 307, 334, 389, 494].

2.C.1 - Localización de las β-lactamasas

Las β-lactamasas son enzimas ampliamente distribuidas entre diversos géneros y especies bacterianas, tanto grampositivos como gramnegativos, así como en el género *Streptomyces*.

En las bacterias gramnegativas las β-lactamasas son intracelulares y generalmente se localizan en el espacio periplásmico. Protegen la célula intentando mantener la concentración del antibiótico que ha llegado al espacio o gel periplásmico por debajo del nivel que causa la inactivación de las PFPs. Son generalmente cefalosporinasas o de amplio espectro y tienen menor afinidad que las de los grampositivos.

Las cefalosporinasas hidrolizan de manera preferente las cefalosporinas pero también algunas penicilinas como aminopenicilinas y ureidopenicilinas por lo que realmente son penicilinasas y cefalosporinasas. Estas β-lactamasas pueden ser constitutivas o inducibles y de origen cromosómico o plasmídico. La resistencia está determinada por la cantidad de β-lactamasas, de su capacidad de hidrólisis y de la reducción de la permeabilidad [110, 149].

Las β-lactamasas de las bacterias gramnegativas han sido clasificadas por diversos autores, siendo muy numerosas y complejas. La primera aceptada como referencia fue la de Richmond y Sykes (1973) en la que distinguieron cinco clases de β-lactamasas en función de diversos parámetros.

TABLA 19.-MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE β-LACTAMASAS, SEGÚN PHILIPPON Y COLS., 1989 [111]

BACTERIAS				HONGOS
Grampositivas		**Gramnegativas**		
Cocos	Bacilos	Cocos	Bacilos	
Staphylococcus *Enterococcus*	*Bacillus* *Clostridium* *Corynebacterium* *Actinomyces* *Nocardia* *Mycobacterium*	*Neisseria* *Branhamella*	Enterobacterias *Haemophilus* *Pasteurella* *Bordetella* *Pseudomonas* *Acinetobacter* *Achromobacter* *Alcaligenes* *Flavobacterium* *Aeromonas* *Campylobacter* *Legionella* *Bacteroides* *Fusobacterium* *Eikenella* *Capnocytophaga*	*Streptomyces*

A partir de esta clasificación se han realizado varias, la que tiene mayor aceptación y resulta más completa es la de Bush, Jacoby y Medeiros (1995) (tablas 20, 21, 22) que las clasifica en función de la especificidad del sustrato y la susceptibilidad a la inhibición por el ácido clavulánico:

1. Cefalosporinasas no inhibidas por el ácido clavulánico.
2a. Penicilinasas inhibidas por el ácido clavulánico.
2b. β-lactamasas de amplio espectro inhibidas por el ácido clavulánico
2be. Igual que las anteriores pero de espectro ampliado.
2br. β-lactamasas de amplio espectro con fijación reducida por el ácido clavulánico.
2c. β-lactamasas que hidrolizan la carbenicilina y son inhibidas por el ácido clavulánico.
2d. β-lactamasas que hidrolizan la cloxacilina.
2e. Cefalosporinasas inhibidas por el ácido clavulánico.
2f. β-lactamasas que hidrolizan a las carbapenemas (no metaloenzimas)
3. Metalo-β-lactamasas no inhibidas por el ácido clavulánico.
4. Penicilinasas parcialmente inhibidas por el ácido clavulánico [69, 70, 71, 149, 282, 283, 315].

TABLA 20.- CLASIFICACIÓN DE LAS β-LACTAMASAS SEGÚN RICHMOND Y SYKES (1973) [110, 149]		
Clase I		
Cefalosporinasas de origen cromosómico. Inhibidas por isoxazolil penicilinas, carbenicilina y por algunos halopeniciloatos, no por ácido clavulánico ni sulbactam.	Peso molecular: 24.000-46.000. Perfil: pen 100, amp 100, carb 5, clox 0, cer 150-8000.	Encontradas en: *Enterobacter* *E. coli, Morganella* *Proteus vulgaris* *Providencia* *Pseudomonas* *Klebsiella, Serratia* *Citrobacter*
Clase II		
Penicilinasas de origen cromosómico. Inhibidas por isoxazolil penicilinas y por ácido clavulánico pero no por carbenicilina.	Peso molecular: 25.000-30.000. Perfil: pen 100, amp 150, carb 40, clox 0, cer 10.	Encontradas en: *Proteus mirabilis* *E. coli.*
Clase III		
Enzimas de origen plasmídico, de amplio espectro, que hidrolizan penicilinas y cefalosporinas. Inhibidas por pCMB, isoxazolil penicilinas, ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. Poca actividad frente a carbenicilina.	Peso molecular: 17.000-29.000. Perfil: pen 100. amp 180, carb 10, clox 0 cer 150. Tipo (de amplio espectro): TEM, SHV, HMS.	Encontradas en: *E. coli, Haemophilus* *Neisseria, Salmonella* *Shigella, Pseudomonas* Son las enzimas más distribuidas por todo el mundo.

- pen = penicilina, amp = ampicilina, carb = carbenicilina, clox = cloxacilina cer = cefaloridina, pCMB = para-cloromercuriobenzoato.
- En esta clasificación no están incluidas las β-lactamasas de las bacterias grampositivas ni ciertas enzimas como las sintetizadas por *Stenotrophomonas maltophilia*.

TABLA 21.- CLASIFICACIÓN DE LAS β-LACTAMASAS SEGÚN RICHMOND Y SYKES (1973) [110, 149]

Clase IV		
Enzimas cromosómicas, semejantes a las anteriores, de amplio espectro, que hidrolizan penicilinas y cefalosporinas. Inhibidas por ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. Resistentes a la inhibición por isoxazolil penicilinas, carbenicilina y pCMB.	Peso molecular: 18.000-25.000. Perfil: pen 100, amp 150, carb 50, clox 20, cer 70.	Encontradas en: *Klebsiella* *Branhamella* *Bacteroides* *M. catarrhalis*
Clase V		
Un grupo heterogéneo de β-lactamasas plasmídicas que hidrolizan penicilinas y cefalosporinas. Inhibidas por ácido clavulánico. Hidrolizan mejor las isoxazolil penicilinas que las cefalosporinas.	Peso molecular: 12.000-32.000. Perfil: pen 100, amp 300, carb 70, clox 200, cer 50. Tipo: OXA 1,2,3; PSE 1,2,3,4.	Encontradas en: *E. coli* *Pseudomonas*

- pen = penicilina, amp = ampicilina, carb = carbenicilina, clox = cloxacilina, cer = cefaloridina, pCMB = para-cloromercuriobenzoato.
- En esta clasificación no están incluidas las β-lactamasas de las bacterias grampositivas ni ciertas enzimas como las sintetizadas por *Stenotrophomonas maltophilia*.

TABLA 22.- COMPARACIÓN ENTRE LAS PRINCIPALES CLASIFICACIONES DE β-LACTAMASAS [69, 70, 71, 149, 282, 283, 315]

Clasificación de Bush, Jacoby y Medeiros	Clasificación de Richmond y Sykes	Sustratos	C*	E*	M*	Enzimas
1	Ia, Ib, Id	Cefalosporinas	-	-	C	Cromosómicas de gramnegativos: AmpC de *E. coli* AmpC de *E. cloacae* AmpC de *P. aeruginosa*
					C	MIR-1, MOX-1, FOX-1
2a	No incluido	Penicilinas	+	-	A	βlas de *K. pneumoniae*
					A	Penicilinasas grampositivos: *S. aureus* (A, B, C, y D)
2b	III	Penicilinas, cefalosporinas	+	-	A	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	No incluido, excepto K1 de clase IV	Penicilinas, cefalosporinas, monobactamas	+	-	A	TEM-3 a TEM-29 SHV-2 a SHV-7
2br	No incluido	Penicilinas	±	-	A	TEM-30 a TEM-42, TRC-1
2c	II, V	Penicilinas, carbenicilina	+	-	A	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	V	Penicilinas, isoxipenicilinas	±	-	D	OXA-1 a OXA-15, PSE-2
2e	Ic	Cefalosporinas	+	-	A	βCrI, Cefalosporinasas inducidas por *Proteus vulgaris*
2f	No incluido	Penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas	+	-	A	NMC-A de *E. cloacae* Sme-1 de *S. marcescens* IMI-1
3	No incluido	La mayoría de los β-lactámicos, incluyendo carbapenemas	-	+	B	L1 de *S. maltophilia* CcrA de *B. fragilis* CphA, PCM-1, IMP-1
					B	βlas de *P. aeruginosa*
4	No incluido	Penicilinas	-	ND	ND	Penicilinasa de *B. cepacia*

C* = Inhibición por el ácido clavulánico ND = No Determinado
E* = Inhibición por el EDTA βlas=β-lactamasas
M* = Clase molecular de la β-lactamasa según Ambler.

2.C.2 - Producción de β-lactamasas

Según el mecanismo de producción de las β-lactamasas, éstas pueden clasificarse en inducibles y constitutivas.

Las enzimas constitutivas son aquellas que son producidas continuamente por la célula, sin necesitar ningún mecanismo previo para su expresión. Incluyen enzimas como TEM, PSE, OXA y SHV. Las β-lactamasas producidas de forma constitutiva pueden estar codificadas tanto cromosómica como plasmídicamente. Y en general, las β-lactamasas mediadas por plásmidos son constitutivas [85, 334, 389, 399, 489, 502].

Las enzimas inducibles son aquéllas que no son producidas continuamente por la célula, sino que necesitan de cierto tipo de agentes (los inductores) o actividad previa para que comienze su expresión. Las β-lactamasas inducibles, sintetizadas a bajo nivel, en presencia de ciertos antimicrobianos se sintetizan en cantidades hasta 1000 veces superiores. En un principio se estudió el fenómeno de inducción en grampositivos, sin embargo hoy ha adquirido más importancia el estudio de este fenómeno en enterobacterias, puesto que algunos de los nuevos antibióticos β-lactámicos de uso clínico tienen un importante efecto inductor. Este potente efecto se ha observado especialmente con cefoxitina y en menor grado con cefalosporinas de amplio espectro. También se ha descrito como potente inductor de β-lactamasas al imipenem pero, a diferencia de los anteriores, este aumento en la cantidad de enzimas no altera la sensibilidad de la bacteria a este antibiótico, ni *in vivo* ni *in vitro* [502].

Sólo las β-lactamasas de Clase C ó I y las penicilinasas de S. *aureus*, son inducibles. Las primeras son las más importantes desde un punto de vista clínico. Estas enzimas de Clase I son de codificación cromosómica y se sintetizan de forma inducible en *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sonnei*, algunos *Proteus* indol positivo y algunas especies de *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Morganella* y *Providencia* [85, 334, 389, 399, 489, 502].

La desrepresión en la síntesis de β-lactamasas, en contraste con la inducción, es un hecho estable que ocurre espontáneamente en este grupo de organismos que poseen β-lactamasas de Clase I. La frecuencia de mutación o de aparición de variantes desreprimidas en la síntesis de β-lactamasas ocurre con una frecuencia de una por cada 10^7 a 10^8 células bacterianas. Esta frecuencia ocurre en muchas cepas de *Enterobacter*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa* y, con menos frecuencia, en otras enterobacterias.
La aparición de este tipo de resistencia *in vivo* ocurre con más frecuencia cuando la infección está producida por especies bacterianas típicamente productoras de β-lactamasas inducibles y el foco de dicha infección es relativamente inaccesible al antibiótico. En estos casos las concentraciones que alcance el antibiótico en dicho foco estarán cerca de su valor de CMI, lo que constituye una situación ideal para la selección de mutantes productoras de β-lactamasas [25, 69, 70, 71, 282, 283, 286, 315, 334].

2.C.3 - Codificación de las β-lactamasas

Por su codificación, las β-lactamasas pueden clasificarse en cromosómicas y plasmídicas. Las β-lactamasas codificadas extracromosómicamente pueden extenderse y hacer progresar las resistencias a los antibióticos debido a la fácil transferencia del material genético

que las codifica. Estos genes pueden ser movilizados intragenéticamente por recombinación o transposición e intergenéticamente por transformación, transducción o conjugación.

• **Las β-lactamasas cromosómicas** han sido descritas en muchos géneros y especies bacterianas, en especial en las bacterias gramnegativas. Probablemente la primera β-lactamasa descrita era cromosómica. Son enzimas codificadas por genes estructurales del cromosoma bacteriano y son características de género y/o especie. Su expresión puede ser inducible y, por tanto, incrementada por la presencia de ciertos β-lactámicos. En estas bacterias la presencia de grandes concentraciones periplásmicas de cefalosporinasas cromosómicas se puede producir por dos mecanismos diferentes:

a) *inducción* o elevación transitoria en la síntesis de β-lactamasas, donde los niveles aumentados persisten sólo mientras el inductor está presente en el medio y

b) *desrepresión estable*, donde los niveles aumentados de enzima persisten, incluso en ausencia del inductor, como consecuencia de una mutación espontánea. Este mecanismo es habitual en algunas enterobacterias, *Pseudomonas, Bacteroides, Campylobacter, Acinetobacter, M. catarrhalis, Legionella* y *Pasteurella,* se localizan en el gel o espacio periplásmico y su espectro de hidrólisis, inhibición y producción es muy variado. Las más importantes son:

- *Cefalosporinasas*: están clasificadas dentro de la clase I de Richmond y Sykes o grupo 1 de Bush, son las más frecuentes e importantes en clínica. Pueden ser constitutivas que son poco eficaces *(E. coli)* o inducibles (*Enterobacter*; *Serratia*, *Proteus* indol positivos, *Citrobacter* y *Pseudomonas*) que hidrolizan a la cefaloridina y cefalotina mucho más rápidamente que a la penicilina, y que son inhibidas por la cloxacilina y el aztreonam. Son enzimas con punto isoeléctrico básico.
- *Cefuroximasas o metoxi-iminocefalosporinasas* son semejantes a las anteriores e inactivan también a cefuroxima, cefotaxima y aztreonam pero no a cefoxitina y son inhibidas por el ácido clavulánico. Están clasificadas dentro de la clase I de Richmond y Sykes o grupo 2e de Bush. Pueden ser constitutivas *(Bacteroides* del grupo *fragilis)* o inducibles *(Proteus vulgaris, Burkolderia cepacia,* etc).
- *β-lactamasas no metaloenzimas* que hidrolizan las carbapenemas. Incluidas en el grupo 2f de la clasificación de Bush, Jacoby y Medeiros, de punto isoeléctrico básico y clase molecular A. Descritas en cepas de *E. cloacae* y *Serratia marcescens*.
- *Metaloenzimas*: Estas β-lactamasas requieren un metal como cofactor, hidrolizan los β-lactámicos incluidos los carbapenemes (carbapenemasas) salvo aztreonam. No son inhibidas por el ácido clavulánico, pero sí por el EDTA. Requieren zinc para su actuación, son inducibles e hidrolizan penicilinas y cefalosporinas, incluyendo cefamicinas, así como al imipenem y meropenem. Se encuentran en *S. maltophilia,* algunas especies de *Flavobacteriun, Aeromonas* y *Legionella* también se han descrito, aunque en muy baja frecuencia, en *Bacteroides fragilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* y *Acinetobacter baumannii*.
- *Penicilinasas*: Pertenecen a la clase molecular A y son inhibidas por el ácido clavulánico. Han sido descritas en *Klebsiella* spp. y otras bacterias.

Las β-lactamasas cromosómicas pueden ser causa de resistencia adquirida en el transcurso de un tratamiento por selección de mutantes resistentes [69, 70, 71, 149, 282, 283, 315].

• **Las β-lactamasas plasmídicas** suelen ser constitutivas, de amplio espectro, y con elevados niveles de eficacia y actividad. Están muy extendidas entre las bacterias dada

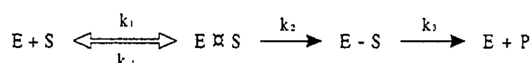
su falta de especificidad. Constituyen el mecanismo de resistencia más diseminado entre las poblaciones bacterianas que causan infección en el hombre. Se han caracterizado numerosas β-lactamasas, las más frecuentes son las TEM-1 y SHV-1 dentro de las de amplio espectro, las OXA-1 y OXA-2 entre las oxacilinasas, y las PSE-1 dentro de las carbenicilinasas [69, 70, 71, 149, 282, 283, 315].

- **Las β-lactamasas plasmídicas de espectro ampliado** comprenden un grupo de enzimas que hidrolizan a los β-lactámicos clásicos y a los incorporados en la última década, que se han desarrollado para evitar la resistencia por las β-lactamasas clásicas. En la actualidad no existe ningún antibiótico β-lactámico que no sea hidrolizado por alguna enzima plasmídica de espectro ampliado, lo que viene a demostrar la capacidad de adaptación de las bacterias que son capaces de desarrollar mecanismos para superar a las nuevas moléculas. Las más representativas son:

- *Oxiimino-β-lactamasas.* Son enzimas que hidrolizan a la totalidad de β-lactámicos, excepto cefoxitina y carbapenemes, y son inhibidas por el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. Están incluidas en el grupo 2be de Bush. El grupo más importante está representado por las β-lactamasas derivadas de las TEM y SHV, y se deben a mutaciones puntuales en los genes plasmídicos que codifican a las β-lactamasas TEM-1 y 2 y SHV-1. Se han descrito preferentemente en enterobacterias (sobre todo en *Klebsiella* spp. y *E. coli)* y ocasionalmente en *Pseudomonas* y *Burkholderia.* La cefotaxima y ceftazidima están considerados como los antibióticos marcadores para la diferenciación fenotípica. Así, estas enzimas se clasifican como cefotaximasas o ceftazidimasas.
- *Cefamicinasas.* Son un grupo de enzimas, incluidas en el grupo 1 de Bush, que inactivan los β-lactámicos. Resultan de la integración en un plásmido de los genes AmpC cromosómicos de *Enterobacter, Citrobacter, Klebsiella* y *P. aeruginosa.* De ellas, las mejor caracterizadas, son MIR-1, MOX-1, CMY-1, CMY-2, BIL-1, LAT-1 y FOX-1. Confieren resistencias a cefamicinas y cefalosporinas (incluidas las de 3ª generación), pero no a carbapenemas.
- *Carbapenemasas.* Estas enzimas se engloban en el grupo 3 de Bush e incluye a β-lactamasas tanto cromosómicas como plasmídicas. Confieren resistencia a la mayoría de los antibióticos β-lactámicos y no son inhibidas por ningún inhibidor de β-lactamasas, aunque sí por el EDTA. Estas β-lactamasas hidrolizan a las penicilinas, cefalosporinas, imipenem y meropenem, son en su mayoría constitutivas y se han descrito en *Serratia marcescens* (IMP-1), *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacteroides fragilis.*
- *Otras.* Existe un grupo de β-lactamasas englobadas en el grupo 2br de Bush que se caracterizan por ser de amplio espectro, resistentes a penicilinas y las asociaciones con inhibidores de β-lactamasas, pero sensibles a las cefalosporinas y otros β-lactámicos. Pertenecen a la clase molecular A y se han aislado fundamentalmente en *E. coli* e incluye desde TEM-30 hasta TEM-42 [69, 70, 71, 149, 282, 283, 315]. Otras β-lactamasas interesantes son las penicilinasas incluidas en el grupo 2a, las carbecilinasas del grupo 2c y las oxacilinasas del grupo 2d de la clasificación de Bush, Jacoby y Medeiros.

2.C.4 - Mecanismo de Acción

Estas enzimas catalizan la hidrólisis de antibióticos β-lactámicos. Su ecuación química general sería :



En esta ecuación, la enzima E y el sustrato S se combinan de forma reversible para dar un complejo enzima sustrato E¤S. Parte de este complejo E¤S va a formar un derivado intermedio E-S con acilación, mediante la formación de un enlace covalente. Finalmente, mediante la desacilación de este último complejo se llega a la liberación de la enzima E y de un producto P que es el antibiótico con su anillo β-lactámico abierto.
Por tanto las β-lactamasas más efectivas serán aquéllas que posean una alta afinidad por sus sustratos potenciales, es decir, un valor bajo de la K_m.

El perfil de sustrato junto con el grado de hidrólisis de las β-lactamasas sobre los antibióticos constituyen las características más importantes de estas enzimas. Los parámetros más exactos para valorar la actividad de estas enzimas son los valores de la hidrólisis máxima V_{max} y la afinidad por la unión con la enzima K_m. Sin embargo, a efectos prácticos se utiliza el cálculo de las tasas de hidrólisis y de la actividad específica.

La eficacia hidrolítica de una enzima se evalúa comparando la hidrólisis que produce sobre un sustrato (antibiótico) determinado frente a la hidrólisis que produce esa misma enzima a la benzilpenicilina o a la cefaloridina.
Estos dos compuestos son los que se suelen utilizar como compuestos de referencia. Los resultados se comparan con los valores de la CMI para ese sustrato y se podrá determinar si la ineficacia frente a la bacteria, que posee dicha enzima, es debida a la inestabilidad frente a las β-lactamasas [68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 264, 282, 283, 295, 315].

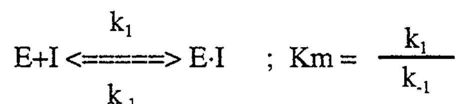
2.C.5 - Inhibición de las β-lactamasas.

MECANISMO DE ACCIÓN.

Los inhibidores de las β-lactamasas pueden ser clasificados según su mecanismo de inhibición enzimática, en reversibles e irreversibles.

Inhibidores reversibles son aquellos inhibidores que se unen a la enzima de tal manera que puede llevarse a cabo una posterior separación de la enzima y recuperación de su actividad. El equilibrio dinámico que presenta este tipo de inhibición puede hacer disminuir la inhibición con la dilución del inhibidor, o con la presencia de moléculas que compiten con éste por el sitio activo de la enzima.

Su ecuación y constante de equilibrio K_m es la siguiente:



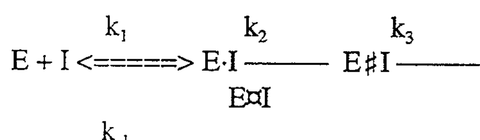
$$E+I \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{<\!=\!=\!=\!=\!=\!>}} E\cdot I \quad ; \quad Km = \frac{k_1}{k_{-1}}$$

K_m es la constante de equilibrio, característica de estos inhibidores. A este tipo de inhibidores pertenecen frecuentemente β-lactámicos. En su mayoría, los inhibidores reversibles son sustratos con alta afinidad por la enzima pero bajas tasas de hidrólisis [67, 70, 73, 74, 265, 282, 295].

Los **inhibidores irreversibles** son aquellos inhibidores que se unen a la enzima de tal manera que no puede llevarse a cabo una

posterior separación de la enzima con recuperación de su actividad.
Generalmente la unión se realiza mediante agentes que se unen a las enzimas covalentemente, modificando permanentemente su grupo funcional, e inactivando por tanto la molécula de la enzima.

Estos inhibidores usualmente requieren un periodo de tiempo determinado para actuar. En este caso la ecuación química correspondiente sería:



Donde E es la enzima, I es el inhibidor, E·I es un complejo reversible que puede disociarse en enzima libre e inhibidor o puede transformarse en un complejo E♯I covalente (acil enzima), y posteriormente en el E¤I que son formas inactivadas de la enzima. Un tipo de estos inhibidores irreversibles son los llamados inactivadores suicidas, que son moléculas que se unen al sitio activo de la enzima y que posteriormente mediante una acción catalítica del propio enzima, al romper la molécula de antibiótico, se inactive a sí misma [70, 74, 282, 295]. (Éstos se estudian con más detalle en el capítulo correspondiente).

NATURALEZA DE LOS INHIBIDORES DE LAS β-LACTAMASAS

El comportamiento de las β-lactamasas frente a los inhibidores, junto con los perfiles de sustrato, son características importantes para distinguirlas entre sí. Las diferencias entre las enzimas con respecto a la inhibición por ácido clavulánico y aztreonam se ha visto que son muy significativas, ya que las cefalosporinasas son más fuertemente inhibidas por el aztreonam que por el ácido clavulánico (que no las inhibe). También la cloxacilina ha sido reconocida como un buen inhibidor de las cefalosporinasas.
El ácido clavulánico, por sí mismo, presenta escasa actividad antibacteriana. Su función primaria es proteger las cefalosporinas y penicilinas de la acción de ciertas β-lactamasas, dejando libre al antibiótico para unirse a las PFPs.
Hay algunos inhibidores que tienen una gran actividad antimicrobiana, porque además son buenos inhibidores, tales como Cefotaxima, Moxalactam y Aztreonam [70, 71, 73, 238, 240].

Otros antibióticos β-lactámicos como las penemas actúan como potentes inhibidores o inactivadores de una amplia variedad de β-lactamasas [69, 70, 71, 282, 283, 315].
La clasificación se ve al final del capítulo 4.
Estos últimos poseen un protón deslocalizado en posición 6-α que junto a la estructura β-lactámica favorecen la formación de un doble enlace, frecuentemente en C6 o en C5, que da lugar a una acil-enzima muy estable que no se hidroliza.
Experimentalmente para el estudio y caracterización de las β-lactamasas se usan otros inhibidores tales como: la cloxacilina, el p-cloromercuriobenzoato (pCMB), cuya actividad inhibitoria indica la presencia de residuos de serina, y la sal disódica del ácido etilendiamino-tetracético (EDTA) cuya inhibición indica que la enzima requiere iones metálicos para su actividad [68, 69, 70, 71, 74, 264, 282, 283, 295, 315].

3 - PENICILINAS O PENAMAS

Las penicilinas son antibióticos naturales o semisintéticos de estructura betalactámica con actividad primariamente bactericida, de corto, medio o amplio espectro; su mecanismo de actuación se realiza específicamente sobre la pared celular.
El compuesto precursor es la penicilina G (bencil-penicilina), agente preferente para uso clínico y sustancia de utilidad en la valoración de la actividad enzimática [360, 486]. La producción a escala industrial se realiza añadiendo ácido fenilacético al medio de cultivo de *Penicillium chrysogenum* (en un principio *Penicillium notatum*) como fuente de la cadena lateral del anillo β-lactámico.
Posterior fue el descubrimiento de la alfa-fenoxi-metil penicilina (penicilina V) que posee la importante propiedad de ser ácido estable, con lo cual puede ser administrada por vía oral.
Las penicilinas semisintéticas provienen todas de modificaciones del núcleo de la penicilina, es decir, el ácido 6-amino penicilánico (6-APA) por la adición de distintas cadenas laterales, agregadas al grupo amino del 6-APA.

Las penicilinas inhiben las enzimas d-alanil-carboxipeptidasas y peptidoglicano-transpeptidasas, impidiendo la formación de los enlaces cruzados en la síntesis de la pared celular bacteriana. Por tanto, solo actúan en la fase de crecimiento de las bacterias, ya que las bacterias en la fase de reposo no sintetizan la pared [111].

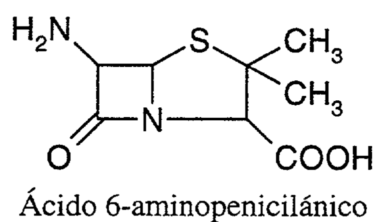
3.A - ESTRUCTURA QUÍMICA

Las penicilinas resultan de la condensación de un anillo de β-lactama (anillo principal) y otro de tiazolidina (anillo secundario). A esta estructura se le añade un grupo carboxílico libre y uno o más grupos amino sobre la cadena lateral, adecuadamente sustituidos. Este compuesto fundamental así formado es el ácido 6-aminopenicilánico (tabla 23).
La ruptura del puente C=O betalactámico hace que el fármaco pierda su acción antibiótica, puesto que cuando dicho puente se abre mediante hidrólisis se obtiene el ácido peniciloico que es bacteriológicamente inactivo. El radical unido a este núcleo betalactámico en posición 6 es el que caracteriza su espectro antibacteriano, ácido-resistencia, sensibilidad o resistencia a las penicilinasas y capacidad de absorción oral. El radical carboxilo unido al anillo tiazolidínico da lugar, según se neutralice con sodio o potasio o se esterifique por sustancias orgánicas, a la mayor o menor solubilidad total del preparado y, en ciertos casos, condiciona también su absorción [260].

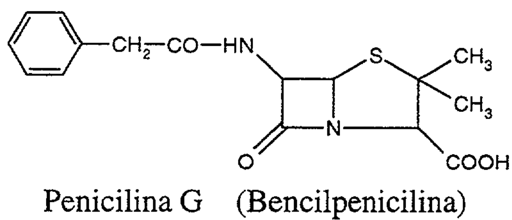
3.B - CLASIFICACIÓN

En las tablas 24 y 25 se muestra la clasificación de las penicilinas según su estructura química. En la tabla 23 se exponen las fórmulas desarrolladas de las penicilinas más representativas.

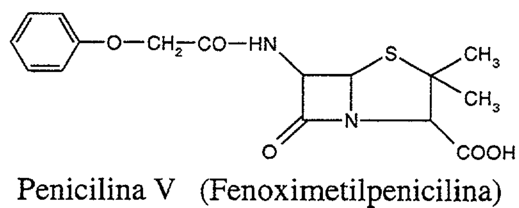
TABLA 23.- ESTRUCTURAS BÁSICAS DE LAS PENICILINAS Y COMPONENTES MÁS REPRESENTATIVOS [2, 111]



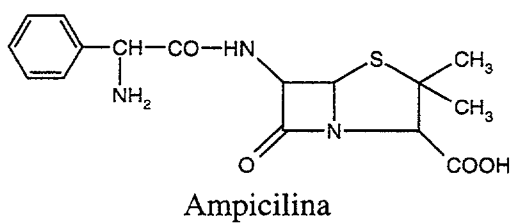
Ácido 6-aminopenicilánico



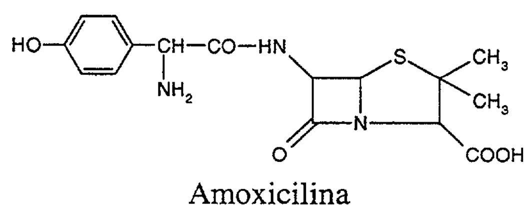
Penicilina G (Bencilpenicilina)



Penicilina V (Fenoximetilpenicilina)



Ampicilina



Amoxicilina

TABLA 24.- CLASIFICACIÓN DE LAS PENICILINAS SEGÚN SU ESTRUCTURA QUÍMICA [110, 401]

Acil-amido penicilinas				
PENICILINAS NATURALES (Espectro reducido)			Penicilina G Penicilina V	
PENICILINAS SEMISINTÉTICAS	**Análogos de la Penicilina V** (fenoxi y fenoxi-alquil penicilinas) (Espectro reducido)		Feneticilina Propicilina Fenbenicilina Fenoxi-isopropil-penicilina Fenoxi-isobutil-penicilina	
	Análogos de la Penicilina G (Espectro reducido)		Clometocilina Azidocilina	
	Estables frente a la penicilinasa estafilocócica (Espectro reducido)		Meticilina Nafcilina Ancilina Pirazocilina Quinacilina	
			Isoxazolil-penicilinas	Oxacilina Cloxacilina Dicloxacilina Flucoxacilina
	Aminopenicilinas de amplio espectro	No activas frente a *P. aeruginosa*	Ampicilina Epicilina Fibracilina Amoxicilina Betacina Ciclacilina	
			Compuestos que se hidrolizan en el organismo liberando ampicilina	Hetacilina Metampicilina Pivampicilina Talampicilina Bacampicilina
		Activas frente a *P. aeruginosa*	Piperacilina	
	Otras penicilinas de amplio espectro	Carboxipenicilinas	Carbenicilina Ticarcilina Apalcilina	
			Compuestos que se hidrolizan en el organismo liberando carbenicilina	Carindacilina Carfecilina
		Sulfopenicilinas	Sulfocilina (Sulbenicilina)	
		Sulfoamino-penicilinas	Suncilina	

<table>
<tr><th colspan="3">TABLA 25.- CLASIFICACIÓN DE LAS PENICILINAS SEGÚN SU ESTRUCTURA QUÍMICA (Cont.) [110, 401]</th></tr>
<tr><td colspan="3">Acil-ureido penicilinas</td></tr>
<tr><td>Semisintéticas. Amplio espectro.
Activas frente a Pseudomonas aeruginosa</td><td colspan="2">Azlocilina
Mezlocilina</td></tr>
<tr><td colspan="3">Amidino penicilinas</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Semisintéticas. Amplio espectro.
No activas frente a Pseudomonas aeruginosa</td><td colspan="2">Mecilinama</td></tr>
<tr><td>Compuestos que se hidrolizan en el organismo liberando mecilinama</td><td>Pivmecilinama
Bacmecilinama</td></tr>
</table>

3.C - MODO DE ACCIÓN

Las penicilinas, y en general todas las betalactaminas, interfieren el paso metabólico final de la formación de la pared celular, quedando, por ello, laxa, incompleta y muy propensa al estallido y ruptura frente a soluciones no isotónicas con las del protoplasma.

Las penicilinas inhiben las enzimas d-alanil-carboxipeptidasa y peptidoglican-transpeptidasa, impidiendo la formación de los enlaces cruzados en la síntesis de la pared celular de la bacteria. Por este mecanismo las penicilinas actúan en fase de crecimiento, ya que las bacterias en fase de reposo no sintetizan pared.

Las penicilinas, tanto en grampositivos como gramnegativos, se unen, de forma no selectiva, a varias PFPs simultáneamente, con excepción de la mecilinama que, en los bacilos gramnegativos, se fija, exclusivamente, a la PFP2, por eso su combinación con otras penicilinas, cefalosporinas o cefamicinas es, habitualmente, sinérgica al complementarse su unión a las PFPs. Sin embargo, en las bacterias grampositivas el mecanismo de acción de la mecilinama no parece que sea diferente del de las otras penicilinas [13, 166, 186, 280, 282, 284, 300, 426].

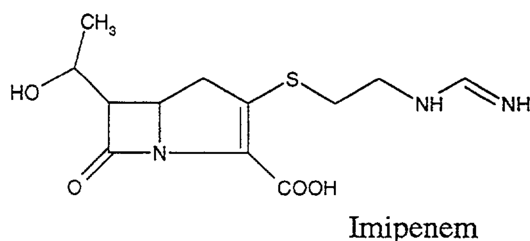
4 - PENEMAS Y CARBAPENEMAS

4.A - ESTRUCTURA QUÍMICA

Las penemas son sustancias de estructura β-lactámica que resultan de la condensación de un anillo de β-lactama (anillo principal) y otro de tiazolina (anillo secundario) no saturado con un doble enlace entre las posiciones 2 y 3. A esta estructura se le añade un grupo carboxílico libre en posición 3 (ver los núcleos básicos de las penemas, carbapenemas, penamas, clavamas, cefemas y oxacefemas en la tabla 18).

El átomo sustituyente en la posición 1 puede ser el habitual de azufre (dando lugar a las penemas), o el carbono (originando las carbapenemas).

El imipenem es el antibiótico de este grupo que más usos presenta en clínica. Su fórmula desarrollada es la siguiente:



Imipenem

El imipenem tiene una cadena lateral hidroxietílica que está unida al anillo β-lactámico en posición *trans*. Esta singular configuración lo hace excepcionalmente estable ante las β-lactamasas bacterianas.

4.B - PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

El imipenem es un compuesto cristalino, de color blanco a parduzco, no higroscópico, sensible a la luz ultravioleta, escasamente soluble en agua y ligeramente soluble en metanol. La cilastatina sódica es un producto amorfo, de color blanquecino a blanco amarillento, higroscópico, muy soluble en agua y en metanol [2, 111].

4.C - CLASIFICACIÓN

En la tabla 26 se muestra la clasificación de las penemas y carbapenemas según su estructura química.

TABLA 26.- CLASIFICACIÓN DE LAS PENEMAS, CARBAPENEMAS Y MONOBACTAMAS [110]	
Carbapenemas	
Ácidos Olivánicos	
Compuestos PS	
Carpetimicinas	Carpetimicina A y B
Asparenomicinas	Asparenomicina A, B y C
Epitienamicinas	Epitienamicina A, B, C y D
Tienamicinas	Tienamicina Decisteaminiltienamicina Imipenem
Monobactamas	
β-lactaminas monocíclicas	Aztreonam

4.D - MODO DE ACCIÓN

El modo de acción es similar al de los otros β-lactamámicos, interfiriendo con la síntesis de la pared celular.
El principal y único antibiótico de este grupo utilizado en clínica es el imipenem, que presenta gran afinidad por la PFP2 y, debido a su configuración espacial *trans*, presenta una gran resistencia a las β-lactamasas plasmídicas.
El imipenem es varios miles de veces más resistente a las β-lactamasas que muchos otros antibióticos estables a estas enzimas, siendo altamente resistente al ataque de las β-lactamasas, tanto de las bacterias grampositivas como gramnegativas, lo mismo si estas enzimas son de origen cromosómico como si están codificadas por plásmidos. El imipenem posee una gran actividad antibacteriana y se emplea para tal fin, aunque colateralmente es asimismo un potente inductor de β-lactamasas y se comporta como un inactivador suicida de éstas, aunque inicialmente actúa como un inhibidor competitivo [111, 282, 489].

La N-formimidoiltienamicina, también denominado imipenem, es hidrolizada e inactivada por la deshidropeptidasa I de origen tubular renal, por lo que se suele acompañar en su formulación junto con un inhibidor específico de dicha enzima, un derivado del ácido heptenoico denominado cilastatina [152], por el cual la deshidropeptidasa I presenta una afinidad unas 30.000 veces mayor que por el antibiótico.

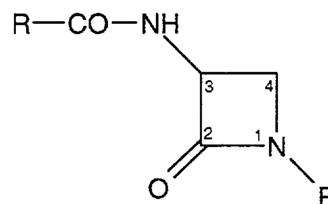
La cilastatina está desprovista de actividad antimicrobiana, no posee efecto inhibidor sobre las β-lactamasas bacterianas y no potencia ni antagoniza la acción del imipenem sobre los microorganismos. Sin embargo, debido a que la cilastatina es un inhibidor reversible competitivo de la deshidropeptidasa I, mejora la excreción urinaria del antibiótico en forma activa que puede llegar a ser del 60 a 75% en las 6 horas posteriores a la administración.
Por todo ello, la cilastatina, en forma de sal sódica, se emplea en asociación con el imipenem, en la proporción 1:1, para su utilización clínica [2, 110].

5 - MONOBACTAMAS

Son sustancias de origen natural obtenidas a partir de bacterias del suelo. El principal representante de este grupo de betalactámicos monocíclicos es el aztreonam obtenido a partir de *Chromobacterium violaceum*. Es estable frente a la mayoría de betalactamasas de gramnegativos, limitándose su espectro de actividad a enterobacterias y *Pseudomonas*, siendo inactivo frente a cocos grampositivos y bacterias anaerobias. Actúa de forma sinérgica con los aminoglucósidos frente a *Pseudomonas* y algunas enterobacterias. Por tener un espectro limitado, se usa en pacientes graves; en tratamientos empíricos debe administrarse en combinación con otros antimicrobianos (aminoglucósidos, vancomicina, metronidazol, eritromicina, etc.) [152].

5.A - ESTRUCTURA QUÍMICA

Las monobactamas, monolactamas o monolactaminas tienen como estructura básica el ácido 3-amino-monobactámico o 3-AMA. A partir de este núcleo básico se han sintetizado cientos de derivados por sustitución de los radicales en posición 1 y 4, y mediante las diferentes esterificaciones y sustituciones del grupo carboxílico.



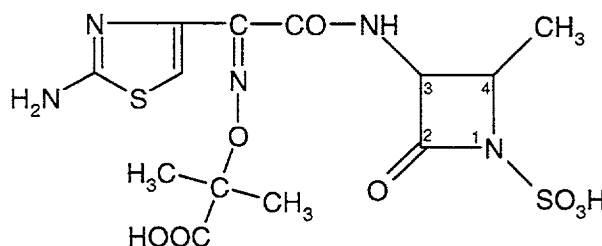
Ácido 3-amino-monobactámico (3-AMA)

El aztreonam es el antibiótico más representativo del grupo [2, 110].

5.B - MODO DE ACCIÓN

El modo de acción es similar al de los otros β-lactamámicos, interfiriendo con la síntesis de la pared celular.

El principal antibiótico de este grupo utilizado en clínica es el aztreonam, que presenta gran afinidad por la PFP3 (septopeptidoglican-transpeptidasa) principalmente, lo cual da lugar a que se produzca filamentación bacteriana antes de que ocurra la lisis celular [2, 110].



Aztreonam

6 - CEFALOSPORINAS

Las cefalosporinas y cefamicinas, denominadas en conjunto cefemas, son antibióticos semisintéticos de estructura β-lactámica, con actividad primariamente bactericida, de amplio espectro, que actúan sobre las bacterias sensibles inhibiendo la síntesis de la pared celular y que precisan, para poder ejercer su acción, que los microorganismos se encuentren en su fase de crecimiento.

Está contraindicado su empleo en enfermos con historia previa de hipersensibilidad a los antibióticos betalactámicos y debe reducirse su dosificación en enfermos con insuficiencia renal.

La actividad antibiótica de las cefalosporinas fue descubierta en 1945 por Brotzu en caldos de cultivo de hongos del género *Cephalosporium*. De una de las primitivas sustancias antibióticas se produjo en 1955 la concentración de otra sustancia que fue denominada cefalosporina C.
De esta cefalosporina C se derivan las cefalosporinas semisintéticas elaboradas por un mecanismo similar al de las penicilinas semisintéticas.
En 1972 se describió un nuevo grupo o familia de sustancias antibióticas que, aunque está íntimamente relacionada con la de las cefalosporinas, constituye una entidad distinta: las cefamicinas [2, 110].

6.A - ESTRUCTURA QUÍMICA

Las cefalosporinas son sustancias que resultan de la condensación de un anillo de β-lactama (anillo principal) y otro de dihidrotiazina (anillo secundario) (tabla 18). Los anillos no son coplanares sino que están doblados a lo largo del eje C6-N5. Sólo la cefalosporina C se encuentra en la naturaleza, aislándose a partir de hongos del género *Cephalosporium*. El núcleo fundamental de esta cefalosporina es el ácido 7-amino-cefalosporánico (7-ACA), que está sustituido con dos cadenas laterales o radicales: un grupo acetilo y un residuo aminoadípico. Las cefalosporinas utilizadas hoy clínicamente son derivados semisintéticos de este ácido, obtenidos por modificación de las dos cadenas laterales en posición 3 y 7.
Estas modificaciones van encaminadas a aumentar el espectro, mejorar las propiedades farmacológicas e incrementar la resistencia a las β-lactamasas. Así, las sustituciones en la posición 7 del anillo β-lactámico determinan el espectro antibacteriano, en tanto que las realizadas a nivel de la posición 3 modifican la farmacocinética y metabolismo del fármaco [2, 152].

El moxalactam es una oxacefema, puesto que en el anillo secundario el átomo de azufre en posición 1 de las cefemas está sustituido por uno de oxígeno, por lo que dicho anillo no es de dihidrotiazina sino de dihidrooxazina y el compuesto es considerado una oxacefalosporina; además, comparte con las cefamicinas el radical metoxi (– OCH_3), en posición 7, ausente en las cefalosporinas.

Las cefamicinas se diferencian de las cefalosporinas por poseer un grupo alfa-metoxi en el C7. Todas ellas tienen una estructura básica similar y se han identificado tres cefamicinas (A, B y C). La mayor actividad antibacteriana corresponde a la cefamicina C de la que se han desarrollado tres derivados semisintéticos, la cefoxitina, el cefmetazol y el cefotetan [2, 110].

6.B - PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

Las cefemas se presentan como polvos cristalinos de color blanco o crema, solubles en agua en general, y sensibles a la luz.
Una vez disueltas en agua se pueden formar lactonas insolubles que precipitan lentamente en la solución, siendo esta reacción retardada por el frío.
La cefixima es soluble en metanol, moderadamente soluble en etanol y acetona, y prácticamente insoluble en agua, éter y éster acético.

6.C - CLASIFICACIÓN

En la tabla 27, 28 se muestra la clasificación de las cefalosporinas según su generación. En las tablas 30 y 31 se exponen las fórmulas desarrolladas de las cefalosporinas más representativas.

Las cefalosporinas se han agrupado en generaciones de acuerdo a su espectro de actividad y resistencia a las β-lactamasas.

Primera generación: Todas estas cefalosporinas tienen un espectro de actividad similar con pequeñas diferencias. Son estables frente a betalactamasas estafilocócicas y de algunas bacterias gramnegativas, por tanto son activas frente a cocos grampositivos, en particular estafilococos incluyendo los productores de betalactamasa y algunas enterobacterias (*E. coli, Klebsiella pneumoniae* y *Proteus* indol negativos). La más utilizada por vía parenteral es cefazolina y por vía oral cefalexina, cefadroxilo y cefaclor (algunos lo incluyen en la segunda generación).

Segunda generación: Este grupo, bastante heterogéneo, se caracteriza por un incremento del espectro de acción frente a enterobacterias oportunistas, que inactivan a las de primera generación (cefuroxima, cefonicida, cefoxitina). Son más activas que las de primera generación frente a *E. coli, Klebsiella* y *Proteus* indol negativos y extienden el espectro a *Neisseria gonorrhoeae* productor de β-lactamasas, *Haemophilus influenzae, Proteus* indol positivos y en ocasiones frente a otras enterobacterias. Algunos compuestos como cefoxitina son activos frente a bacterias anaerobias, pero ninguno es activo frente a *P. aeruginosa*.
Esta generación también está caracterizada por una mayor resistencia a la inactivación a las β-lactamasas de *H. influenzae* (cefprozilo y loracarbef) siendo en lo demás semejantes a las de primera generación. La vía de administración es parenteral excepto para el éster axetilo de la cefuroxima, cefprozilo y loracarbef. Existen notables diferencias farmacocinéticas entre ellas [2, 33, 41, 88, 91, 110, 148, 152, 183, 432, 490].

Tercera generación: Este grupo posee un amplio espectro de actividad frente a la gran mayoría de los bacilos gramnegativos y mejores propiedades farmacocinéticas que el grupo anterior, en particular, su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica. Son estables frente a la mayoría de betalactamasas de gramnegativos.
Su espectro de actividad incluye enterobacterias, *Pseudomonas* (solo ceftazidima y cefoperazona), *Haemophilus* y cocos grampositivos y gramnegativos. Están indicadas en infecciones graves por enterobacterias y *Pseudomonas* asociadas a un aminoglucósido. Constituyen la base de numerosos tratamientos empíricos [2, 33, 88, 91, 110, 152, 183, 490].
Los compuestos más utilizados por vía parenteral son cefotaxima, ceftriaxona, ceftizoxima y ceftazidima. Cefixima, cefpodoxima proxetil y ceftibuteno son de administración oral y son poco activos frente a grampositivos [152].
En general las cefalosporinas de 2ª y 3ª generación son menos activas frente a cocos

grampositivos que las de la primera generación y poco eficaces frente a anaerobios, salvo la cefoxitina y cefminox [207, 358].

Cuarta generación: Presentan una mayor actividad que las de tercera generación frente a grampositivos y gramnegativos (incluida *P. aeruginosa*). Ésta se debe a que penetran mejor y tienen más afinidad por las PFPs que por las β-lactamasas. Incluyen cefepima y cefpiroma. Tienen una actividad similar si bien cefpiroma es ligeramente más activa frente a grampositivos [2, 33, 88, 91, 110, 152, 183, 490].

TABLA 27.- CLASIFICACIÓN DE LAS CEFALOSPORINAS SEGÚN SU GENERACIÓN [2, 48, 110, 152, 260, 401]

Cefalosporinas de 1ª Generación				
Cefalosporinas	Cefalotina	I	+	
	Cefapirina	I	+	
	Cefazolina	I	+	
	Cefradina	O	+	
	Cefadroxilo	O	+	
	Cefalexina	O	+	
	Cefacetrilo	X	+	
	Cefaloglicina	X	+	
	Cefaloridina	X	+	
Cefalosporinas de 2ª Generación				
Cefalosporinas	Cefamandol	I	+	
	Cefonicida	I	–	
	Cefuroxima	I	–	
	Cefaclor	O	+	
	Cefprozilo	O	–	
	Cefuroxima axetilo	O	–	
	Loracarbef	O	–	
	Cefatrizina	X	+	
	Cefotiam	X	+	
Cefamicinas	Cefoxitina	I	A	
	Cefmetazol	I	+	⇩
	Cefotetán	X	+	
	Cefbuperazona	X	+	

Vía de utilización: **I** = Vía parenteral **O** = Vía oral **X** = No utilizado en clínica

Espectro de acción / Uso preferente: + = Frente a grampositivos **A** = Frente a anaerobios; – = Frente a gramnegativos **P** = Frente a pseudomonas

⇩ = Baja, utilizado anteriormente en clínica pero retirado actualmente del mercado.

TABLA 28.- CLASIFICACIÓN DE LAS CEFALOSPORINAS SEGÚN SU GENERACIÓN [2, 48, 110, 152, 260, 401]

Cefalosporinas de 3ª Generación		
Aminotiazolil-cefalosporinas	Cefotaxima Cefpodoxima Ceftazidima Ceftizoxima Ceftriaxona Cefixima Cefpodoxima proxetilo Ceftibuteno Cefmenoxima Cefodizima	I – I – I P I – I – O – O – O – X – X –
Tio-acetil-cefalosporina	Cefminox	I A
Alfa-piperacinil-diceto-cefalosporinas	Cefoperazona	I P
Alfa-sulfofenil-cefalosporinas	Cefsulodina	I – ⇓
Oxacefamicinas	Moxalactam o Latamo-xef	I – ⇓
Cefalosporinas de 4ª Generación		
Aminotiazolil-cefalosporinas	Cefepima Cefpiroma	I – I –

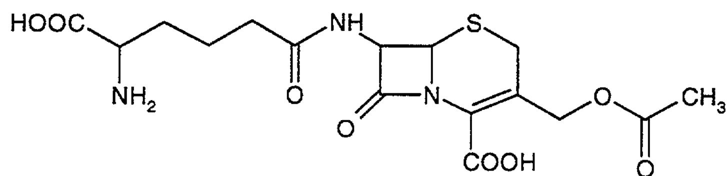
Vía de utilización: **I** = Vía parenteral **O** = Vía oral **X** = No utilizado en clínica

Espectro de acción / Uso preferente: + = Frente a grampositivos – = Frente a gramnegativos **A** = Frente a anaerobios **P** = Frente a pseudomonas

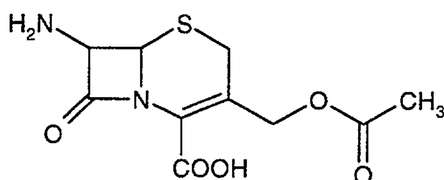
⇓ = Baja, utilizado anteriormente en clínica pero retirado actualmente del mercado.

TABLA 29.- CLASIFICACIÓN DE LAS CEFALOSPORINAS SEGÚN CRITERIOS BIOLÓGICOS. (O'CALLAGHAN, 1979) [48, 353]			
Uso en Medicina Humana			
Parenterales	Sensibles a las β-lactamasas	Estables metabólicamente *Grupo 1*	Cefacetrilo Cefalotina Cefapirina
		Inestables metabólicamente *Grupo 2*	Cefaloridina Cefazolina Ceforanida Cefotiam
	Estables a las β-lactamasas	*Grupo 5*	Cefamandol Cefmenoxima Cefmetazol Cefodizima Cefonicida Cefoperazona Cefotaxima Cefotetán Cefoxitina Cefpodoxima Cefsulodina Ceftazidima Ceftibuteno Ceftizoxima Ceftriaxona Cefuroxima Moxalactam
Orales	Sensibles a las β-lactamasas	*Grupo 3*	Cefaclor Cefadroxilo Cefalexina Cefprozilo Cefradina
	Estables a las β-lactamasas	*Grupo 4*	Cefixima Cefuroxima axetilo Cefpodoxima proxetilo
Uso en Medicina Veterinaria			
		Grupo 6	Cefalonium Cefoxazol
Uso como Reactivos de Laboratorio			
		Grupo 7	Nitrocefina Padac Centa

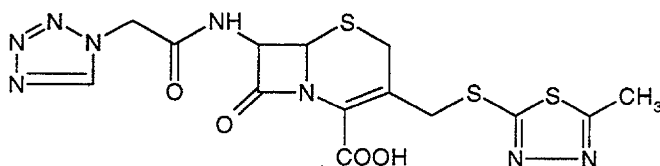
TABLA 30.- ESTRUCTURAS BÁSICAS DE LAS CEFALOSPORINAS MÁS REPRESENTATIVAS [2, 110].



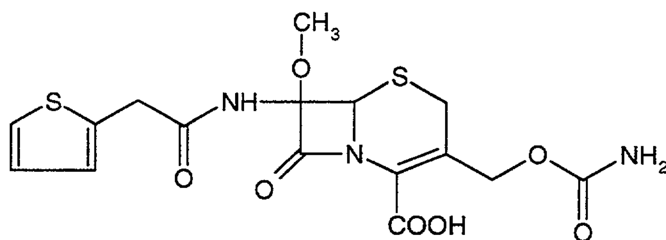
Cefalosporina C



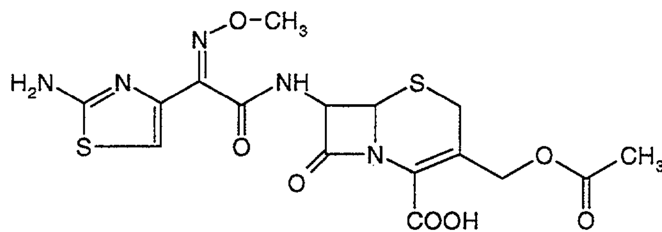
Ácido 7-amino-cefalosporánico (7-ACA)



Cefazolina

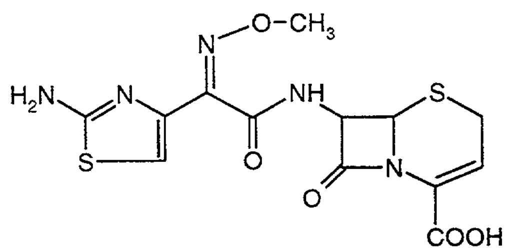


Cefoxitina

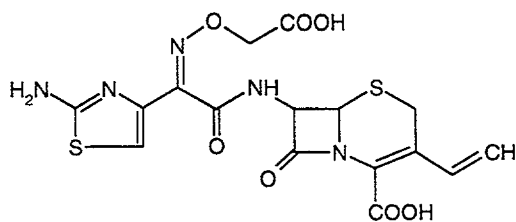


Cefotaxima

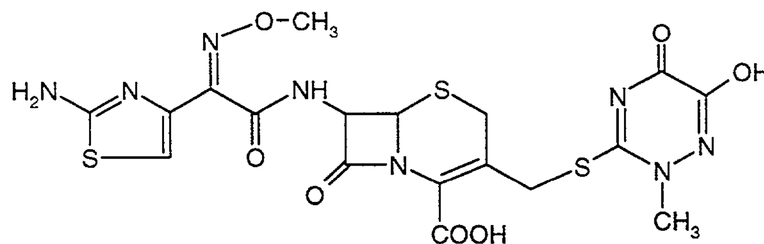
TABLA 31.- ESTRUCTURAS BÁSICAS DE LAS CEFALOSPORINAS MÁS REPRESENTATIVAS [2, 110](Cont.)



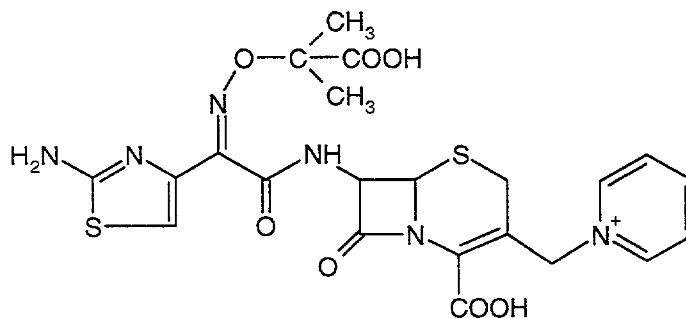
Ceftizoxima



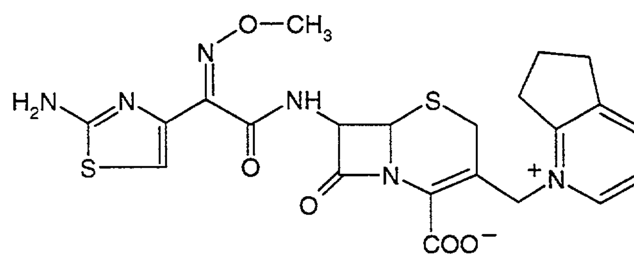
Cefixima



Ceftriaxona



Ceftazidima



Cefpiroma

6.D - MODO DE ACCIÓN

Las cefemas, al igual que las penicilinas, inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana de los microorganismos sensibles al impedir la biosíntesis del peptidoglicano por competición con las PFPs.

La actividad antibacteriana de las cefemas depende de tres factores:

1.°) Accesibilidad a las enzimas "diana" (PFPs), a través de la membrana externa.
2.°) Resistencia a las β-lactamasas.
3.°) Afinidad por las PFPs.

La afinidad de las diversas cefemas por las PFPs es variable, si bien son bloqueadas más de una por cada uno de estos antibióticos. En general, puede decirse que las cefalosporinas bloquean preferentemente la PFP1a, tienen una escasa acción sobre PFP1b y es nula o insignificante para el resto de las PFPs; por el contrario, las cefamicinas ejercen su efecto fundamentalmente frente a las PFPs 1a, 1b, 5 y 6 [2, 91, 110, 490].

6.C - FARMACOLOGÍA

ABSORCIÓN

Las cefalosporinas orales tienen una buena y rápida absorción digestiva en general, con una biodisponibilidad de, aproximadamente, un 90-95%, salvo el cefaclor que lo hace en un 70%.
Las concentraciones séricas máximas obtenidas después de una inyección intramuscular se alcanzan a los 30 minutos.
Las concentraciones séricas máximas después de la ingestión de una cefalosporina oral se alcanza en un tiempo variable que oscila entre los 45 minutos para la cefradina y las 4 horas para la cefixima.

DISTRIBUCIÓN

La difusión tisular y humoral de las cefemas es buena, pudiendo encontrarse niveles terapéuticos en tejidos y líquidos orgánicos tales como esputo, orina (principal vía de eliminación con excepción de la cefoperazona que se excreta preferentemente por la bilis), líquidos pleural, ascítico, pericárdico y sinovial, humor acuoso, pulmón, hígado y riñón.
Las concentraciones en bilis son variables, siendo el cefamandol el que consigue las más elevadas y en forma activa, pues al carecer de grupo acetoxi no es desacetilado. Después del cefamandol, la cefalosporina de mayor eliminación biliar es la cefoperazona, pues esta vía constituye su principal mecanismo excretor. Otras cefalosporinas con tasas de eliminación biliar superiores a los niveles sanguíneos son cefotaxima, cefoxitina, cefuroxima, cefazolina, ceftriaxona, cefmetazol y cefixima.

Estos fármacos difunden mal al cerebro y, en general, atraviesan con gran dificultad la barrera hematoencefálica; no obstante, el cefacetril, la cefuroxima, la cefoxitina, la cefotaxima, el moxalactam, la cefoperazona, la ceftazidima, la ceftizoxima y la ceftriaxona, pueden conseguir niveles terapéuticos en el LCR en sujetos con meninges inflamadas. Habitualmente, aunque con excepciones individuales como en el caso de la cefazolina, alcanzan concentraciones en la placenta y poseen una buena difusión transplacentaria, pudiendo detectarse en el líquido amniótico y en la sangre fetal.
La cefapirina, el cefamandol, la ceftazidima y la ceftriaxona alcanzan buenos niveles en el tejido óseo [110].

La semivida biológica de las cefemas es muy variable y oscila entre los 30 minutos de la cefalotina y las 8 horas de la ceftriaxona. La conjugación a proteínas plasmáticas también es muy variable y oscila entre el 6% para la cefradina y el 90% para la ceftriaxona. La vida media del fármaco se prolonga en sujetos con insuficiencia renal, salvo en el caso de la cefoperazona que, por tener la bilis como vía principal de eliminación, no se ve modificada sustancialmente; sin embargo, en pacientes con insuficiencia hepática no sólo se incrementa la semivida sino su tasa de excreción urinaria.

ELIMINACIÓN: METABOLISMO Y EXCRECIÓN

Generalmente sufren poca metabolización y ésta suele ser hepática, renal o intestinal, mediante oxidaciones, reducciones, conjugaciones e hidrólisis.
La eliminación de las cefemas se efectúa principalmente por vía urinaria, recuperándose de un 55-90% de la dosis administrada, con excepción de la cefixima y la cefoperazona, que son las que tienen la menor excreción por esta vía. La cefoperazona se elimina predominantemente por la bilis, y la ceftriaxona posee una elevada eliminación biliar, aunque no predominante.

Con ambas cefalosporinas, la excreción urinaria aumenta en la insuficiencia hepática y la eliminación por la bilis se incrementa con la insuficiencia renal.
También se excretan en parte por la bilis, el cefamandol, la cefotaxima, la cefoxitina, el cefmetazol, la cefazolina, la cefuroxima y la cefixima.

La eliminación urinaria de las cefalosporinas y las cefamicinas, como la de las penicilinas, se realiza mediante filtración glomerular y secreción tubular [2, 91, 110, 490].

6.F - ESPECTRO DE ACTIVIDAD

Las cefemas, consideradas en conjunto, en comparación con el otro grupo de antibióticos β-lactámicos (penicilinas), son sustancias con menor actividad intrínseca. Su espectro de actividad depende de la eficacia intrínseca de la cefema así como de su resistencia a las β-lactamasas. Dependiendo de dicha actividad intrínseca, podemos agrupar a las cefalosporinas en cuatro grupos:

En un primer grupo podemos englobar a la cefalotina y cefaloridina (ensayadas en este estudio de tesis) y otras como cefalexina, cefapirina, cefazolina, cefradina, cefacetrilo y cefadroxilo, todas ellas de la primera generación, así como al cefaclor y cefprozilo, cefalosporinas orales de segunda generación. Todas ellas presentan un espectro antibacteriano de amplitud media, actuando preferentemente sobre bacterias grampositivas aeróbicas, especialmente cocos. Son activas frente a cocos grampositivos tales como estafilococo (tanto penicilín-sensible como penicilín-resistente), estreptococos alfa y β-hemolíticos y neumococo; cocos gramnegativos tipo gonococo y meningococo; bacilos grampositivos como *Listeria monocytogenes*, clostridios, *Corynebacterium diphtheriae y Bacillus anthracis*. También son sensibles algunas especies gramnegativas. La actividad sobre bacilos gramnegativos es variable según los géneros e incluso las especies, por lo que antes de instaurar un tratamiento en una infección por este tipo de bacterias es preciso realizar la correspondiente prueba de sensibilidad *in vitro*; no obstante, suelen ser activas frente a *Pasteurella* sp., *Escherichia coli, Proteus mirabilis, Klebsiella* sp., *Shigella* sp. y *Salmonella* sp.; son inactivas frente a enterococo, *Brucella* sp., *Bordetella, Pseudomonas, Serratia marcescens, Enterobacter* sp., *Proteus* indolígenos, *Citrobacter* sp. y

Acinetobacter sp. Son activas frente a espiroquetas y *Actinomyces* e inactivas frente a micobacterias [2, 10, 32, 33, 41, 42, 80, 91, 92, 104, 111, 171, 224, 231, 381, 403, 411, 416, 422, 438, 459, 481, 482, 490, 507, 508]

El grupo constituido por las cefalosporinas de 2ª generación: cefamandol, cefonicida, cefuroxima y cefuroxima axetilo, y las de 3ª generación: cefixima, cefotaxima, cefpodoxima, cefpodoxima proxetilo, ceftibuteno, ceftizoxima y ceftriaxona, se caracteriza por presentar un espectro antibacteriano de tipo medio con acción más marcada sobre las bacterias gramnegativas aeróbicas. Este grupo es activo frente a estreptococos β-hemolíticos, *Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Escherichia coli, Klebsiella* sp., *Proteus* sp., *Enterobacter aerogenes, Serratia marcescens, Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Yersinia enterocolitica, Aeromonas* sp., *Pasteurella* sp., *Clostridium perfringens, Fusobacterium* sp., *Propionibacterium* sp., *Peptococcus* sp., *Peptostreptococcus* sp., *y Veillonella* sp.; muestra poca actividad frente a *Streptococcus viridans y Pseudomonas aeruginosa*, variable ante *Enterobacter cloacae, Citrobacter* sp. *y Bacteroides fragilis* y es prácticamente inactivo frente a otras especies de *Pseudomonas* distinta de *P. aeruginosa, Acinetobacter calcoaceticus, Listeria monocytogenes, Streptococcus faecalis y Clostridium difficile.*
La actividad de la ceftizoxima frente a *Staphylococcus* suele ser menor que la de la cefotaxima, en tanto que la actividad de la ceftriaxona suele ser excepcional frente a *Neisseria gonorrhoeae* [2, 10, 31, 34, 40, 41, 51, 88, 94, 103, 111, 171, 183, 189, 244, 245, 250, 378, 416, 432, 437, 445, 457, 485, 490, 504].

Un tercer grupo está constituido por las cefalosporinas de tercera generación cefoperazona y ceftazidima, y por las de cuarta generación cefepima y cefpiroma. Se caracterizan por su amplio espectro y por ser activas frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Las de tercera generación tienen una marcada acción sobre bacterias gramnegativas, pero su efecto sobre grampositivos y anaerobios es generalmente débil. Las de cuarta generación presentan un espectro antibacteriano muy amplio, con elevado grado de actividad, tanto sobre las bacterias grampositivas como estreptococos y estafilococos, como sobre las bacterias gramnegativas, aunque más marcadamente sobre estas últimas; asimismo presentan una discreta actividad sobre el complejo *Mycobacterium avium* (CMA), pero prácticamente carecen de efecto sobre las bacterias anaerobias; del mismo modo, presentan un elevado grado de resistencia a la degradación por β-lactamasas, tanto plasmídicas como cromosómicas, aunque no tienen apenas capacidad de inducción de β-lactamasas de tipo I [2, 34, 79, 105, 158, 171, 226, 246, 356, 395, 402, 417, 439, 453, 478].

El cuarto y último grupo está constituido por cefalosporinas de segunda generación como cefoxitina y cefmetazol, y de tercera como cefminox.
Éste es un grupo que se caracteriza por su amplio espectro antibacteriano, con acción más marcada sobre bacterias gramnegativas, especialmente las anaeróbicas. Asimismo son inactivas frente a *Pseudomonas*.
Este grupo en general, es activo frente a cepas de *Serratia marcescens, Klebsiella pneumoniae, Morganella morganii, Providencia rettgeri, Citrobacter freundii, Enterobacter aerogenes, Proteus mirabilis y Escherichia coli, Proteus vulgaris, Providencia, Enterobacter cloacae, Haemophilus influenzae*, estafilococo, neumococo, estreptococos (a excepción de enterococo), *Neisseria* sp., *Shigella* sp., *y Salmonella* sp. Es inactivo frente a *Pseudomonas y Alcaligenes*. Su especial interés estriba en su efectividad frente a bacterias anaerobias tales como

Bacteroides, Fusobacterium, Bifidobacterium, Eubacterium, Propionibacterium, Veillonella, Peptococcus y *Peptostreptococcus*, mientras que suelen ser resistentes las bacterias del género *Clostridium* [2, 111, 171, 207, 243, 325, 351, 358, 429, 434].

6.G - TOXICIDAD Y EFECTOS SECUNDARIOS

•• Sus efectos adversos más importantes son las reacciones de hipersensibilidad y de nefrotoxidad, ambos de gravedad variable:

- Las reacciones de hipersensibilidad se presentan con menor frecuencia que con las penicilinas y pueden ser cruzadas con éstas. Esta incidencia de reacciones cruzadas es del 6-9%.
- La nefrotoxicidad ha sido descrita para la cefaloridina y se presenta menos frecuentemente, y a dosis mas altas, para la cefalotina.

•• Otras reacciones adversas observadas han sido:

- Alteraciones gastrointestinales como dolor abdominal, náuseas, vómitos y diarreas. También se han observado casos esporádicos de colitis pseudomembranosa por sobreinfección por bacterias resistentes. Estos trastornos se producen fundamentalmente con preparados orales o de eliminación biliar.
- Alteraciones hematológicas: leucopenia, trombocitopenia, eosinofilia, anemia hemolítica, trastornos de la coagulación y de la función plaquetaria y test de Coombs positivo, entre otras.
- Alteraciones hepáticas con aumento de las transaminasas y de la bilirrubina.
- Alteraciones neurológicas leves como cefaleas, mareos, vértigos, alucinaciones, confusión metal y somnolencia.
- Otras alteraciones como inflamación de las mucosas, efecto antabús, sobreinfecciones por microorganismos resistentes, dolor e induración en el punto de inyección intramuscular y flebitis en el caso de inyección intravenosa [2, 111, 171].

7 - INHIBIDORES DE LAS β-LACTAMASAS

Uno de los mecanismos más eficaces para la supervivencia de las bacterias es la producción de β-lactamasas, enzimas hidrolíticas que destruyen los antibióticos betalactámicos. Estas enzimas se pueden encontrar en la mayoría de las bacterias grampositivas y gramnegativas, así como en las levaduras, las cianobacterias, las algas azul-verdosas e, incluso, en el riñón de los mamíferos.
Los inhibidores de β-lactamasas son sustancias de estructura betalactámica (clavamas, derivados del ácido penicilánico o penemas), de origen natural o semisintético, con escasa actividad antibacteriana pero con un amplio y potente espectro anti-β-lactamásico, lo que confiere un alto grado de protección, contra estas enzimas hidrolíticas, a las penicilinas lábiles con las que se asocian (amoxicilina, ticarcilina, ampicilina, piperacilina).

La primera observación de una inhibición notable se produjo con una serie de compuestos procedentes de una cepa de *Streptomyces olivaceus*. Posteriormente, se demostró que esta actividad se debía a la producción de una familia de componentes, a los que se denominaron ácidos olivánicos.

En 1973 se detectó otro potente efecto inhibidor con una cepa de *Streptomyces clavuligerus;* al producto responsable se le denominó ácido clavulánico, considerándosele como el más importante desarrollo en la historia de las β-lactamasas y sus inhibidores. Al producto natural, así como a los derivados semisintéticos obtenidos a partir de él (ácido desoxiclavulánico y éter bencílico del ácido clavulánico), se les denominan *clavamas*, debido a que contienen en su estructura el anillo principal de las β-lactamas.

Las clavamas son inhibidores de las β-lactamasas, naturales o semisintéticos, de estructura beta lactámica, de escasa actividad antibacteriana pero de amplio espectro antienzimático, que actúan mediante un mecanismo de inhibición selectiva, progresiva e irreversible que origina la inactivación por bloqueo de las β-lactamasas que las reconocen como sustratos; de esta manera, cuando se combinan con antibióticos lábiles, que sufren el efecto hidrolítico de dichas enzimas, aquéllos recuperan su actividad contra las bacterias productoras de las mismas.

De todos ellos, el primero que se ha utilizado en clínica es el ácido clavulánico, el cuál, combinado con la amoxicilina o la ticarcilina ha mostrado ser farmacocinéticamente compatible con ambas penicilinas (tanto por vía oral como intravenosa), y está indicado su empleo en cuadros ocasionados por microorganismos sensibles [2, 111, 149, 166].

El sulbactam es una sulfona del ácido penicilánico que por sí misma tiene escasa actividad antibacteriana excepto contra *Neisseria meningitidis* y *Neisseria gonorrhoeae* y que se comporta como un inhibidor irreversible de varias β-lactamasas y que se administra en asociación con la ampicilina, por vía parenteral en la proporción 2:1 (ampicilina : sulbactam).

El tazobactam también es una sulfona del ácido penicilánico que por sí misma tiene escasa actividad antibacteriana, excepto contra *Brahamella catarrhalis*, y que se comporta como un inhibidor irreversible de varias β-lactamasas incluyendo los tipos I, III, IV y V de Richmond y Sykes. Además posee

capacidad de unirse a la PFP2 [152]. Casi no se absorbe por vía oral por lo que se administra por vía parenteral. Debido a que tiene una farmacocinética similar a la de la piperacilina, se asocia con este antibiótico, en la proporción 8 : 1 (piperacilina : tazobactam).
El tazobactam se ha mostrado como un buen inhibidor de cefalosporinasas de *P. aeruginosa*, *E. cloacae*, *C. freundii*, *S. marcescens* y *M. morganii* [5, 376]. Asimismo, la combinación piperacilina-tazobactam se ha mostrado muy efectiva frente a aislamientos clínicos de enterobacterias portadoras de β-lactamasas de espectro ampliado [364]

7.A - ESTRUCTURA QUÍMICA

Las penemas y la cilastatina han sido expuestos anteriormente junto con las penemas y carbapenemas.
Las clavamas tienen una estructura básica típica de una β-lactama, concretamente una oxapenama, es decir, una penama en la que el átomo de azufre en posición 1 es sustituido por uno de oxígeno, por lo que el anillo secundario en lugar de ser de tiazolidina es de oxazolidina. El miembro principal de este grupo es el ácido clavulánico.

Los derivados del ácido penicilánico tienen como estructura básica la sulfona de dicho ácido.
En la tabla 33 se exponen las fórmulas desarrolladas de las moléculas más representativas.

7.B - PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

El ácido clavulánico, en su forma de sal potásica (clavulanato potásico) que es la que se emplea en la clínica, se presenta como un polvo blanco o amarillo pálido, muy higroscópico, muy soluble en agua, soluble en metanol, poco soluble en etanol e isopropanol, y escasamente soluble en acetona.

7.C - CLASIFICACIÓN

En la tabla 32 se muestra la clasificación de los inhibidores de las β-lactamasas según su estructura química.
Otros muchos antibióticos β-lactámicos son inhibidores de las β-lactamasas aunque no se emplean como tales sino como auténticos agentes antibacterianos; en contraposición, algunos (cefalotina, cefaloridina, cefoxitina, cefotaxima, ceftazidima, imipenem), son potentes inductores de dichas enzimas, y se da la paradoja, por ejemplo, en el caso de cefoxitina e imipenem, que poseen, al mismo tiempo, actividades como inhibidores e inductores de β-lactamasas de bacilos gramnegativos como *Enterobacter* y *Proteus* [2, 111, 149, 166].

TABLA 32.- CLASIFICACIÓN DE LOS INHIBIDORES DE LAS β-LACTAMASAS [2, 48, 110]	
Clavamas	Ácido clavulánico y derivados
Derivados del ácido penicilánico	Sulfonas del ácido penicilánico Sulfona del ácido 6-α-cloro-penicilánico Sulfona del ácido 6-β-bromo-penicilánico Sulfona de la meticilina Sulfona de la quinacilina Ácido 6-acetilmetilen-penicilánico
Carbapenemas	Ácidos olivánicos Compuestos PS Carpetimicinas Asparenomicinas Epitienamicinas Tienamicinas
Derivados del ácido heptenoico	Cilastatina

TABLA 33.- ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS INHIBIDORES DE LAS β-LACTAMASAS Y COMPUESTOS RELACIONADOS [2, 111]

Ácido Clavulánico	Ácidos Oliványcos
Sulfonas del ácido penicilánico	Cilastatina Sódica

7.D - MODO DE ACCIÓN

Con excepción de la cilastatina, que está desprovista de actividad antibacteriana, los restantes inhibidores de estas enzimas poseen cierto grado de actividad frente a algunos microorganismos. Sin embargo, estas sustancias no se emplean solas sino asociadas con diversas penicilinas, ejerciendo sobre éstas una auténtica función protectora.

El inhibidor bloquea la β-lactamasa mediante un **mecanismo de acción** múltiple:

- *selectivo* (el inhibidor se comporta como un sustrato de gran especificidad por la enzima),
- *competitivo* (el inhibidor y el antibiótico con el que se asocia compiten por la β-lactamasa pero el primero posee una mayor afinidad por ella),
- *progresivo* (cuanto mayor es la concentración del inhibidor más moléculas de β-lactamasa son bloqueadas y, además, la reacción química entre ambos progresa en función del tiempo).

La **clasificación de los inhibidores de β-lactamasas por su modo de acción** es importante porque esta división nos dará una idea de la permanencia del efecto inhibitorio. Se pueden clasificar en: *reversibles* e *irreversibles*.

Los inhibidores **reversibles** o competitivos son aquéllos que se unen a la enzima de tal

forma que ésta puede recuperar su actividad, estableciéndose un equilibrio entre ella y el inhibidor. La unión entre ambos se establece mediante un enlace no covalente. Debido a que dicho equilibrio es dinámico, la inhibición puede disminuirse diluyendo el inhibidor o aportando otra sustancia que se una a la enzima en el mismo lugar que lo hace el inhibidor.
Los inhibidores reversibles de las β-lactamasas que se unen en el sitio activo (o sus proximidades) de la enzima son, a menudo, β-lactámicos que pueden actuar tanto de inhibidores como de sustratos. Muchos de ellos, son sustratos débiles que poseen una elevada afinidad por la enzima, pero que son hidrolizados por ésta a tasas bajas.

Los inhibidores **irreversibles** o inactivadores enzimáticos, suelen ser más efectivos que los reversibles, ya que pueden ocasionar la anulación de la actividad de la β-lactamasa. El bloqueo de la β-lactamasa por parte del inhibidor se mantiene durante el suficiente tiempo como para que la enzima permanezca sin función inactivadora sobre el antibiótico asociado el tiempo necesario para que éste actúe sobre la bacteria. Un tipo especial de éstos lo constituyen los llamados *inactivadores suicidas*; estos inactivadores son moléculas que, inicialmente, se unen al sitio activo de la enzima, alterándose en su estructura química, lo que imposibilita su posterior liberación y ocasionando la inactivación total de dicha enzima. Ambos, inhibidor y enzima quedan permanentemente inutilizados, lo que puede considerarse como un suicidio. El primer inactivador suicida descrito en la literatura fue el ácido clavulánico [2, 111, 149, 166].

Sin embargo, esta división, a veces, no es completamente real puesto que algunos de los primeros producen una inactivación parcial de la enzima y la mayor parte de los segundos tienen una fase inicial competitiva.
Un ejemplo de inhibidores competitivos lo constituyen las penicilinas resistentes a las β-lactamasas, las cefalosporinas y cefamicinas, así como el imipenem y el aztreonam.

Los inactivadores enzimáticos mejor conocidos son el ácido clavulánico, el sulbactam y el tazobactam.
En los bacilos gramnegativos, los inhibidores de β-lactamasas, para ser eficaces, deben atravesar la membrana externa y alcanzar, en concentraciones adecuadas, el espacio periplásmico, donde se localizan estas enzimas; sin embargo, las β-lactamasas de los microorganismos grampositivos como *Staphylococcus* son excretadas al exterior de la célula y, por tanto, los inhibidores no precisan penetrar en el interior de la célula para inactivarlas.
Otro mecanismo de actuación de los inhibidores de β-lactamasas es la afinidad que éstos tengan por las PFPs bacterianas; así, por ejemplo, el ácido clavulánico se fija, preferentemente, a la PFP2 y ocasiona cambios morfológicos semejantes a los provocados por la mecilinama, es decir, formación de bacterias esferoidales sin inteferir en el proceso de división celular.

La amoxicilina, una de las penicilinas que se asocia con el ácido clavulánico, posee afinidad, fundamentalmente, por las PFPs la, lb y 2, y algo menor por la PFP3; en tanto que la ticarcilina se une, preferentemente, a las PFPs la, 3 y 4.

El ácido clavulánico posee un potente efecto inhibidor de las β-lactamasas bacterianas más importantes, lo que incluye a las tipo II, III, IV y V de la clasificación de Richmond y Sykes [2, 5, 111, 149, 166, 285].

5 Clasificación y Características de las Quinolonas

1 - Introducción.
- 1 - Historia.
- 2 - Estructura química.
- 3 - Propiedades físico-químicas.
- 4 - Clasificación.

2 - Actividad antibacteriana.

3 - Mecanismo de acción.
- 1 - Otros efectos inducidos por las quinolonas: La respuesta SOS.

4 - Mecanismos de resistencia.
- 1 - Mutaciones que afectan a la ADN girasa.
  - 1.1 - Papel de la ADN girasa.
- 2 - Importancia de la permeabilidad de la membrana externa (ME).
  - 2.1 - Papel de los componentes de la ME
  - 2.2 - Alteración de las proteínas de la ME y del LPS en *E. coli*.
- 3 - El papel del transporte transmembrana protón-dependiente.

5 - Farmacocinética.
- Absorción.
- Distribución.
- Metabolismo y excreción.

6 - Toxicidad.

7 - Interacciones.

8 - Indicaciones.

9 - Nuevos agentes.

1 - Introducción

1.1 - Historia

La palabra quinolona deriva del término 4-oxo-1,4-dihidroquinoleína, y por tanto son fármacos derivados químicamente de la molécula de la quinoleína. Farmacológicamente derivan del acido nalidixíco, que fue el primero en sintetizarse, y las más actuales contienen átomos de flúor (fluoroquinolonas) lo que les proporciona un mayor espectro tanto frente a bacterias gramnegativas como grampositivas, por lo que se utilizan frecuentemente en la práctica clínica. El mecanismo de acción principal de estos fármacos es mediante la inhibición de la ADN girasa bacteriana [112].

El ácido nalidíxico fue el primero de los derivados de síntesis del grupo de las 1-8 naftiridinas obtenidas por Lesher *et al.* en 1962. En 1968, Turner *et al.* sintetizan el ácido oxolínico. En 1971, Shimizu *et al.* comunican la síntesis del ácido piromídico. En 1973, Wick *et al.* publican la obtención por vía sintética de la cinoxacina. El ácido piperámico o pipemídico fue sintetizado por Shimizu *et al.* en 1975. Posteriormente, el desarrollo de las nuevas quinolonas progresó rápidamente, insistiendo en los derivados de la 7-piperazino-4-quinolona y en particular en el de las que poseen un átomo de flúor (fluoroquinolonas) en la posición 6 del núcleo básico, lo que le confería una mayor actividad antibacteriana [112].

1.2 - ESTRUCTURA QUÍMICA

TABLA 34.- ESTRUCTURAS BÁSICAS RELACIONADAS CON LAS QUINOLONAS	
N N Naftiridina	N N N Piridopirimidina
N N Cinolina	O N H 4-Quinolona

El ácido nalidíxico y la enoxacina derivan de la naftiridina, en tanto que los ácidos piromídico y pipemídico (o piperámico) lo son de la piridopirimidina, y la cinoxacina de la cinolina. Los restantes miembros de esta familia, las quinolonas, derivan todos de la estructura de la 4-oxo-1,4-dihidroquinoleína (4-quinolona). En la tabla 34 se pueden observar los cuatro tipos de estructuras básicas aludidas: naftiridina, cinolina, piridopirimidina y 4-quinolona [2, 112].

Las quinolonas fluoradas se caracterizan por tener un nitrógeno en posición 1 en el cual puede haber variedad de sustituyentes, un grupo carboxilo en posición 3, un grupo ceto en posición 4 y el átomo de flúor en posición 6. Además, dispone de diferentes sustituciones en el carbono 7, entre las que destaca el grupo piperacin-1-ilo (como en norfloxacina, ciprofloxacina y enoxacina), el grupo

4-metil-piperacin-1-ilo (como en pefloxacina, ofloxacina, difloxacina, fleroxacina y amifloxacina) o el grupo 3-azabiciclo (trovafloxacina) [154, 155] que tienen un efecto potenciador de la actividad antimicrobiana frente a bacterias grampositivas y gramnegativas [93, 475], ya que se ha demostrado que la permeabilidad de la pared bacteriana a la molécula quinoleínica está influenciada por el sustituyente del C7 del anillo 4-oxo-1,4-dihidroquinoleína (4-quinolona en la tabla 34).

La actividad antibacteriana de las quinolonas se debe a la suma de su buena penetración a través de la pared bacteriana y a la inhibición de la ADN girasa. Estos dos procesos son intensificados por la presencia del átomo de flúor en el C6.
Además, las sustituciones en el N1 o en el C7 pueden originar diferencias en las propiedades farmacológicas y farmacocinéticas. De esta forma, la presencia del radical ciclopropilo en el N1 de la molécula de ciprofloxacina le confiere una mayor potencia frente a miembros de la familia *Enterobacteriaceae* y a *Pseudomonas aeruginosa* debido a sus óptimas interacciones electrónicas y estéricas [93].

Por otra parte, se ha comprobado la importancia que tienen las cargas asociadas a los átomos C7 y C8 en la actividad antimicrobiana, y se ha observado un efecto potenciador de la actividad antimicrobiana al disminuir la densidad electrónica en el átomo C7 [142].

1.3 - PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

Las fluoroquinolonas son sustancias cristalinas de color blanco amarillento, poco solubles o insolubles en agua a pH neutro y en disolventes orgánicos, pero solubles en soluciones acuosas ácidas o ligeramente alcalinas. Son fotosensibles, muy estables a la temperatura ambiente y termorresistentes, por lo que pueden esterilizarse en el autoclave [112].

1.4 - CLASIFICACIÓN

En la tabla 35 se muestra la clasificación de las quinolonas, y compuestos relacionados, según su estructura química. En las páginas 121, 122, 123 se exponen las fórmulas desarrolladas de estos compuestos.

TABLA 35.- CLASIFICACIÓN DE LAS QUINOLONAS SEGÚN SU ESTRUCTURA QUÍMICA [112, 154, 155].

DERIVADOS DE LA NAFTIRIDINA			Ácido nalidíxico * Enoxacina
DERIVADOS DE LA CINOLINA			Cinoxacina
DERIVADOS DE LA PIRIDOPIRIMIDINA			Ácido pipemídico o piperámico * Ácido piromídico
DERIVADOS DE LA QUINOLEINA	**Quinolonas no fluoradas**		Ácido oxolínico Acrosoxacina o Rosoxacina Droxacina Miloxacina Tioxacina
	Quinolonas fluoradas o fluoroquinolonas	*Monofluoroquinolonas*	Amifloxacina Ciprofloxacina * Flumequina Irloxacina o Pirfloxacina Moxifloxacina Norfloxacina * Ofloxacina * Pefloxacina
		Difluoroquinolonas	Difloxacina Esparfloxacina * Lomefloxacina *
		Trifluoroquinolonas	Fleroxacina Temafloxacina * Tosufloxacina Trovafloxacina

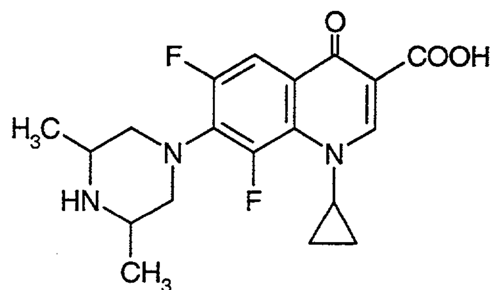
* Quinolonas con las que se ha trabajado en este estudio.

TABLA 36.- ESTRUCTURA QUÍMICA DE LAS QUINOLONAS Y COMPUESTOS RELACIONADOS

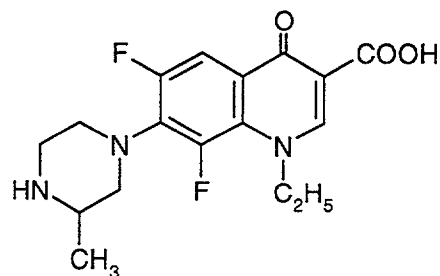
Ácido nalidíxico	Ácido oxolínico
Cinoxacina	Miloxacina
Ácido piromídico	Ácido pipemídico
Acrosoxacina o Rosoxacina	Enoxacina

TABLA 37.- ESTRUCTURA QUÍMICA DE LAS QUINOLONAS Y COMPUESTOS RELACIONADOS (Cont.)	
Amifloxacina	Ciprofloxacina
Flumequina	Irloxacina o Pirfloxacina
Norfloxacina	Ofloxacina
Pefloxacina	Difloxacina

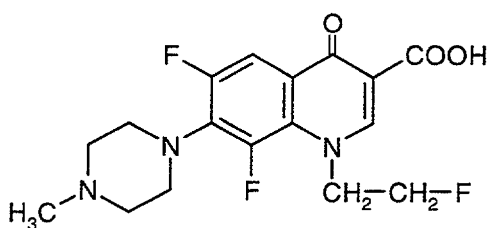
TABLA 38.- ESTRUCTURA QUÍMICA DE LAS QUINOLONAS Y COMPUESTOS RELACIONADOS (Cont.)



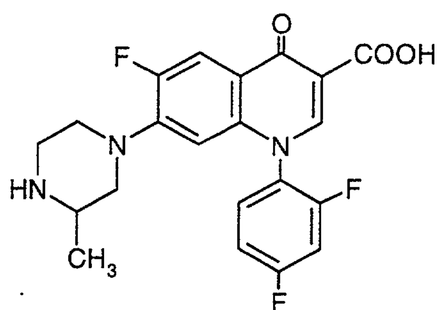
Esparfloxacina



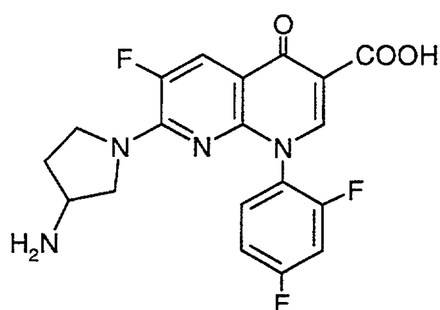
Lomefloxacina



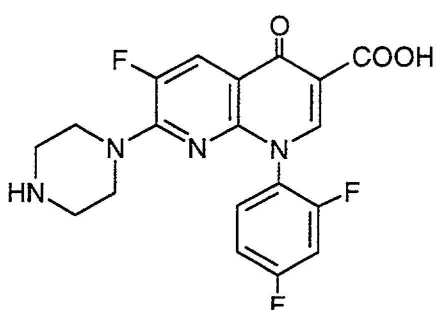
Fleroxacina



Temafloxacina



Tosufloxacina



Trovafloxacina

TABLA 39.- HIDROFOBICIDAD DE LAS QUINOLONAS SEGÚN SUS COEFICIENTES DE PARTICIÓN ENTRE BUFFER FOSFATO 0,1 M a pH 7,2 Y N-OCTANOL [64, 203, 324].

Elemento	Tipo iónico	Hidrofobicidad (coeficiente de partición)
Ácido nalidíxico *	ácido	3,92
Ácido oxolínico	ácido	2,23
Ácido pipemídico *	anfótero	0,03
Ácido piromídico	ácido	11,7
Cinoxacina	ácido	0,03
Ciprofloxacina *	anfótero	0,02
Enoxacina	anfótero	0,007
Esparfloxacina *	anfótero	0,89
Fleroxacina	anfótero	0,08
Flumequina	ácido	13,0
Miloxacina	ácido	1,12
Norfloxacina *	anfótero	0,01
Ofloxacina *	anfótero	0,33
Pefloxacina	anfótero	1,32
Rosoxacina	ácido	10,7
Tosufloxacina	anfótero	0,29

* Quinolonas utilizadas en esta tesis.

2 - ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Las fluoroquinolonas son antimicrobianos con gran actividad *in vitro* frente a bacterias grampositivas y gramnegativas. Dicha actividad *in vitro* de las quinolonas no se ve influenciada, en general, por la cantidad de inóculo, composición del medio o la presencia de suero humano. Aunque se ha observado un efecto aditivo en presencia de sangre, sin embargo, todas las quinolonas conocidas hasta ahora son 60 veces menos activas en orina que en medios de cultivo. Ello es debido probablemente al pH ácido de la orina y a la cantidad de magnesio que puede contener, ya que se ha descrito que la alta concentración de magnesio disminuye la permeabilidad de la pared bacteriana a las quinolonas [50, 147, 211, 400, 475].

La actividad de las quinolonas en general frente a las bacterias gramnegativas es muy amplia, incluyendo algunos géneros bacterianos clásicamente resistentes a otros antibióticos como *Enterobacter, Serratia, Proteus* indol positivos y *Pseudomonas.* No obstante, frente a este último género existen diferencias entre los fármacos, siendo ciprofloxacina la quinolona con mayor actividad [147]. Asimismo, la diarrea producida por *Shigella* se trata con éxito con fluoroquinolonas, siendo la ciprofloxacina la más activa con una CMI_{90} de 0,016 µg/ml [289].
Se ha observado un incremento de la resistencia a *Klebsiella pneumoniae* y *Serratia marcescens* y notable incidencia de alto nivel de resistencia a fluoroquinolonas en *Pseudomonas aeruginosa* [174].
La ciprofloxacina se muestra más activa que la trovafloxacina y grepafloxacina frente a *Pseudomonas aeruginosa*, pero sucede al contrario en *Burkholderia cepacia* y *Acinetobacter* spp. [35].
Las quinolonas también tienen actividad frente a cocos grampositivos, aunque empleadas casi exclusivamente en el género *Staphylococcus,* siendo la trovafloxacina [154], la esparfloxacina y la tosufloxacina las fluoroquinolonas más potentes frente a *Staphylococcus aureus.*
Según un estudio americano multicéntrico de 1992, el 86% de las cepas de *S. aureus* meticilina-resistentes eran también resistentes a quinolonas [206]. Sin embargo, la trovafloxacina muestra 32 veces más actividad que la ciprofloxacina frente a *S. aureus* meticilina-resistentes. La CMI_{90} de trovafloxacina es menor de 1 mg/l frente a las cepas resistentes a meticilina y frente a las cepas resistentes a ciprofloxacina [132, 134], pero la trovafloxacina y sus derivados han sido retirados recientemente del mercado español debido a su toxicidad hepática como se comenta más detalladamente en el apartado de *Toxicidad.*

Las primeras en aparecer tenían una actividad limitada frente a *Streptococcus pneumoniae* que es, en general, poco sensible a las quinolonas. Sin embargo, las nuevas quinolonas como levofloxacina, esparfloxacina, grepafloxacina y recientemente la trovafloxacina y la tosufloxacina han ampliado su espectro con una mayor actividad *in vitro* frente al neumococo, sobre las cepas de neumococo con resistencia a la penicilina y otras especies del género *Streptococcus* [35, 36, 241].
También poseen actividad frente a patógenos habituales del tracto respiratorio. La neumonía en la comunidad está producida en un 49% por *S. pneumoniae* y menos por otras bacterias como *Legionella pneumophila, Chlamydia pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae* y *Coxiella burnetti.* Frente a estas infecciones extrahospitalarias la esparfloxacina es una alternativa válida [30]. No obstante, la grepafloxacina es más activa que la amoxi-

cilina en el tratamiento de neumonías comunitarias producidas por *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* [1, 1, 442].
En exacerbaciones bacterianas agudas de la bronquitis crónica está indicado el uso de esparfloxacina, levofloxacina o trovafloxacina que van a actuar bien frente a *S. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis* [267, 487].
La neumonía nosocomial suele estar producida tanto por bacilos gramnegativos como los pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* y *Haemophilus influenzae* como por cocos grampositivos del tipo *S. aureus* y *S. pneumoniae*, y más raramente por otras bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. Su tratamiento en conjunto es dificultoso ya que la ciprofloxacina y ofloxacina que serían las más idóneos poseen escasa actividad frente a cocos grampositivos y anaerobios [267, 487].
La ciprofloxacina, ofloxacina y esparfloxacina se muestran muy activas frente a *M. tuberculosis* y otras micobacterias, sin embargo la trovafloxacina se muestra poco activa [209, 237].
Frente a cepas resistentes de *M. tuberculosis*, la esparfloxacina es más activa que la ciprofloxacina. Dicha resistencia a fluoroquinolonas en *M. tuberculosis* se asocia a mutaciones en el gen *gyrA* [495].
En *Mycobacterium avium* se realizaron estudios para valorar la actividad antibacteriana de las quinolonas combinadas con antibióticos de otros grupos, observándose que la combinación esparfloxacina y etambutol frente a este microorganismo fue sinérgica en 9 de 10 cepas procedentes de aislamientos clínicos [50, 211, 400]. Cuando la rifampicina se añadió como un tercer agente se produjo sinergismo frente a todas las cepas. Cuando se eliminó el etambutol, el efecto observado con la combinación esparfloxacina-rifampicina fue de antagonismo. En general, y frente a *Mycobacterium avium*, las combinaciones de la esparfloxacina, junto con otros antimicrobianos, se mostraron más activas *in vitro* que las combinaciones de la ciprofloxacina.

Sólo la trovafloxacina y la clinafloxacina tienen una actividad elevada frente a anaerobios, siendo media la actividad de la grepafloxacina y esparfloxacina y baja la del resto de quinolonas [19, 154]. En otras investigaciones realizadas sobre la actividad frente a bacterias anaerobias, las combinaciones de ciprofloxacina por vía parenteral o de ofloxacina con metronidazol o clindamicina y las combinaciones de enoxacina o fleroxacina por vía oral con metronidazol, clindamicina u ornidazol, no afectaron a la farmacocinética de la quinolona ni a la actividad anaeróbica [50, 211, 400].

La cinoxacina y los ácidos pipemídico, piromídico, nalidíxico y oxolínico son activos frente a muchas bacterias gramnegativas, pero no poseen ninguna actividad frente a bacterias grampositivas, excepto el ácido oxolínico que presenta cierta actividad frente a *Staphylococcus aureus*. Frente a *Pseudomonas aeruginosa* es interesante la acción del ácido pipemídico, con una CMI que suele oscilar entre 8 y 32 µg/ml, mientras que la cinoxacina y los ácidos piromídico, oxolínico y nalidíxico son inactivos.

En enfermedades de transmisión sexual podemos destacar la falta de actividad frente a *Treponema pallidum*, la falta de eficacia a dosis única en algunos síndromes y su contraindicación en embarazadas, niños y adolescentes.
Sin embargo, la norfloxacina, ciprofloxacina y ofloxacina son eficaces en la gonococia no complicada y en el chancro blando. En cambio la trovafloxacina es más eficaz frente a *N. gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis*.

La norfloxacina y la lomefloxacina tienen un espectro antibacteriano bastante amplio, siendo activas tanto frente a bacterias grampositivas como gramnegativas, incluyendo

Pseudomonas aeruginosa, pero son inactivas frente a bacterias anaerobias estrictas [112].

Asimismo, se ha observado que la esparfloxacina es activa *in vitro* frente a microorganismos gramnegativos como *Pseudomonas aeruginosa,* frente a grampositivos como *Streptococcus* y frente a bacterias anaerobias. Tanto la trovafloxacina, como la esparfloxacina y la ciprofloxacina son igualmente eficaces frente a un amplio número de bacterias, aunque la trovafloxacina y la esparfloxacina son más activas frente a las bacterias anaerobias y cocos grampositivos que la ciprofloxacina [154].

Swanson *et al.* en 1991 evaluaron la actividad *in vitro* de la temafloxacina, ciprofloxacina y ofloxacina frente a aislados clínicos de patógenos respiratorios. Los tres fármacos tenían potente actividad frente a bacterias gramnegativas, incluyendo *Haemophilus influenzae, Klebsiella pneumoniae, Moraxella catarrhalis y Bordetella pertussis,* pero frente a bacterias grampositivas temafloxacina se ha mostrado como el más potente frente a *Staphylococcus aureus* (CMI_{90} 0,12 µg/ml) y *Streptococcus pneumoniae* (CMI_{90} 0,5 µg/ml) [50, 211, 400].

La pefloxacina es muy eficaz como tratamiento a dosis única en la cistitis no complicada de la mujer causada por enterobacterias, ya que tiene una vida media y una eliminación urinaria prolongadas [10].
También tiene una excelente actividad sobre los microorganismos que causan con mayor frecuencia osteomielitis, infecciones de piel y de tejidos blandos. La mayor parte de las enterobacterias son sensibles a pefloxacina, con una CMI menor de 2 µg/ml. Sobre *Pseudomonas aeruginosa* es menos activa, ofreciendo una CMI entre 1 y 16 µg/ml. Frente a *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* se muestra moderadamente activa, aunque cada vez es mayor el número de cepas resistentes [208, 215, 236, 450]. La pefloxacina ha demostrado una buena eficacia en el tratamiento de las infecciones hospitalarias por *Escherichia coli, Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa.* Se puede considerar de elección en el tratamiento de infecciones urinarias complicadas, y constituye una buena alternativa en el tratamiento de las neumonías nosocomiales, de las infecciones intraabdominales por bacterias gramnegativas y en las bacteriemias por gramnegativos y *Staphylococcus,* incluidos los resistentes a meticilina. En estos casos y en los de infecciones por *Pseudomonas* y *Acinetobacter,* debe efectuarse una vigilancia especial que permita detectar la aparición de resistencias, debiéndose utilizar en tratamientos combinados. También es muy útil en monoterapia en el tratamiento de la fiebre tifoidea y en las bacteriemias por *Salmonella* [208, 215, 236, 450].

La moxifloxacina (BAY 12-8039) es una nueva fluoroquinolona de cuarta generación estructuralmente relacionada con la ciprofloxacina y con la gatifloxacina. Posee un amplio espectro presentando gran actividad frente a bacterias gramnegativas aerobias, siendo también activa frente a grampositivos anaerobios y *Mycobacterium tuberculosis.*
La moxifloxacina mantiene una buena actividad *in vitro,* como la de las quinolonas de segunda y tercera generación, frente a enterobacterias, *P. aeruginosa* y otros bacilos gramnegativos aerobios, pero es más activa frente a cocos gramnegativos aerobios y *B. fragilis.* Aunque es menos eficaz que la ciprofloxacina frente a *P. aeruginosa,* lo es más que ella frente a *S. maltophilia.* También es activa sobre *H. influenzae, Moraxella catarrhalis* y *Neisseria* spp. Tiene una buena actividad antiestafilocócica, siendo muy superior a la de la ciprofloxacina y es muy activa sobre *S. aureus* sensibles y resistentes a meticilina frente a neumococos, enterococos, y anaerobios como *B. fragilis* y *C. perfringens.* Es activa frente a *M. tuberculosis* y *Chlamydia* spp. y tiene actividad moderada

frente a *Helicobacter pylori* y *Brucella melitensis*. Es muy eficaz frente a *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *C. pneumoniae* y *Legionella pneumophila* [242, 382, 433, 464].

Tiene una vida media de 10-12 horas y presenta una unión a proteínas plasmáticas del 30-45%.

En resumen, es una fluoroquinolona de amplio espectro, que incluye a cepas sensibles y resistentes a penicilinas, cefalosporinas, macrólidos y ciprofloxacina, de administración una sola vez al día por vía oral, que puede alcanzar altas concentraciones en suero y con reducidos efectos tóxicos, entre los que cabe destacar las náuseas (7,8%) y las diarreas (5,7%). En los ensayos clínicos, en sinusitis, bronquitis y neumonías comunitarias, presenta una tasa de éxito superior al 90%. Debido a todo ello, la moxifloxacina, se perfila como una nueva quinolona enfocada a las infecciones del tracto respiratorio [49, 50].

3 - MECANISMO DE ACCIÓN

Las quinolonas presentan un efecto bactericida por la inhibición de la topoisomerasa II bacteriana, denominada ADN-girasa [64, 75, 101, 140, 162, 216, 217, 218, 312, 326, 385, 418, 440, 448, 470, 472, 505]. Esta enzima es una de las responsables del superenrollamiento del ADN bacteriano. Su inhibición produce una carencia de espacio en el citoplasma bacteriano incapaz de contener la estructura del ADN sin enrollar [112, 311].
La ADN-girasa es la enzima bacteriana que facilita el superenrrollamiento del ADN mediante el uso de la energía libeada en la hidrólisis del ATP. La enzima de *Escherichia coli* consiste en dos proteínas, GyrA y GyrB, de masa molecular 97 kDa y 90 kDa, respectivamente, codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB*. Por tanto, la enzima activa conforma en conjunto un tetrámero A2B2 de peso molecular 400 kDa. Se piensa que el mecanismo de superenrrollamiento de ADN por la girasa involucra los pasos siguientes: el recubrimiento de un segmento de ADN (~ 120 bp) por el complejo A2B2; corte de la doble hélice del ADN recubierto con conservación de la energía liberada por el enlace hidrolizado mediante la formación de un enlace covalente transitorio entre un resto de tirosina (Tyr122) de la subunidad A de la proteína GyrA y el extremo 5' libre del ADN; el paso de una cadena de ADN sobre la otra a través del punto de ruptura y la regeneración de los enlaces fosfodiéster hidrolizados (reparación del corte).

La topoisomerasa IV [57, 115, 116, 117, 118, 120, 121, 138, 195, 217, 311, 350, 366, 367, 368, 470, 472, 483] es otra enzima, recientemente descubierta, que participa en la segregación de los bucles de ADN replicados. Recientes trabajos han determinado que la topoisomerasa IV es también una diana para las quinolonas, y en algunas bacterias grampositivas, la topoisomerasa IV es la diana principal [138, 311, 366, 367, 368]. Las dos subunidades de la topoisomerasa IV, ParC y ParE [57, 115, 116, 117, 118, 120, 121, 195, 350, 470, 483] son homólogas con las subunidades de la ADN girasa, y las regiones de la subunidad GyrA y GyrB implicadas en la susceptibilidad a quinolonas están particularmente representadas en ParC y ParE. Se ha demostrado que las actividades de relajación y decadenación de la topoisomerasa IV purificada son inhibidas por el ácido oxolínico y la norfloxacina, aunque a concentraciones 3-30 veces mayores que aquéllas que inhiben la ADN girasa purificada. En este sentido se ha descrito recientemente una mutación en *Escherichia coli*, en la región de los genes del cromosoma que codifica las subunidades de la topoisomerasa IV, y más concretamente en el locus *nfxD* [440]. Esta mutación fue identificada en una cepa altamente resistente que contiene múltiples mutaciones y su fenotipo de resistencia fue condicional, siendo expresado sólo aditivamente en presencia de un alelo mutante resistente *gyrA*. La introducción de un plásmido que portaba un gen sensible *gyrA+* complementó la resistencia de ambas mutaciones *gyrA* y *nfxD*.

Según algunos autores, la interacción de la fluoroquinolona con el ADN se realizaría a través de las cargas negativas de la molécula. Sin embargo, los estudios de resonancia magnética nuclear no han demostrado una interacción directa entre el ADN y la quinolona. Investigaciones recientes han demostrado la posibilidad de que dicha interacción se

establezca a través de puentes de magnesio [29, 217, 365].

Al acercarse la quinolona al ADN bacteriano, la presencia del grupo carboxílico del antimicrobiano interferiría con la alta densidad de cargas negativas del ADN. Sin embargo, el complejo magnesio-quinolona que estaría cargado positivamente favorecería la interacción, ya que el magnesio podría interactuar electrostáticamente con los grupos fosfatos del ADN. Eventualmente, dos moléculas de quinolona podrían estar a su vez unidas por magnesio provocando un efecto cooperativo. Aún, no está totalmente aclarado si la quinolona también puede establecer eficientemente una unión directa con la ADN girasa en ausencia de ácido nucleico.

El hecho de que una alteración en un solo aminoácido de la subunidad A de la ADN girasa provoque una pérdida de actividad de la quinolona sugiere una interacción directa que, sin embargo, aún no ha quedado demostrada. Es cierto que las quinolonas inhiben la actividad enzimática de la girasa, pero siempre se ha demostrado en presencia de ADN, con lo que el resultado es poco concluyente para hacer evidente una unión directa quinolona-girasa.

Investigaciones recientes sugieren que la eficacia de unión de la quinolona para formar el complejo ternario quinolona+ADN+ADN-girasa depende sobre todo de la secuencia de la subunidad A de la ADN girasa, de hecho, en mutantes *gyrA* la unión es muy reducida, lo que da cuenta del mecanismo de resistencia [29, 115, 120, 217, 263, 339, 465, 483].

3.1 - OTROS EFECTOS INDUCIDOS POR LAS QUINOLONAS: LA RESPUESTA SOS.

Se suele considerar que la primera función en la acción bactericida de las quinolonas es la inhibición de la síntesis del ADN debido a la interacción del fármaco con la ADN girasa bacteriana [144, 388, 390]. Dicha interacción genera lesiones en el ADN, lo que induce la respuesta SOS como consecuencia de este efecto.

La respuesta SOS, caracterizada en *Escherichia coli*, es desencadenada por una acumulación de daños en el ADN o cuando la replicación del ADN es inhibida, estando reprimida su expresión en condiciones fisiológicas normales.

Parece que la señal que desencadena la respuesta SOS consiste en regiones de ADN de cadena simple que se producen cuando la célula intenta replicar una plantilla dañada o cuando es interrumpido el proceso normal de replicación del ADN. La unión de este ADN de cadena simple a la proteína RecA, transforma esta proteína en su forma activada.

Como efecto de la activación de la respuesta SOS se produce, pues, la activación de la proteína RecA, una de cuyas funciones es la degradación por escisión del represor LexA y su inactivación como represor. La proteína LexA está reprimiendo la expresión de una serie de genes (genes SOS) cuya expresión se verá aumentada; estos genes están relacionados con la reparación del ADN y entre ellos se encuentran los propios genes *recA*, *lexA* y *uvrABC* y *umuDC*. Cuando la señal activadora desaparece, se inactiva la proteína RecA, el represor LexA se acumula y los niveles normales de los demás productos se recuperan [144, 271, 388, 390].

En la siguiente figura se esquematiza la respuesta SOS:

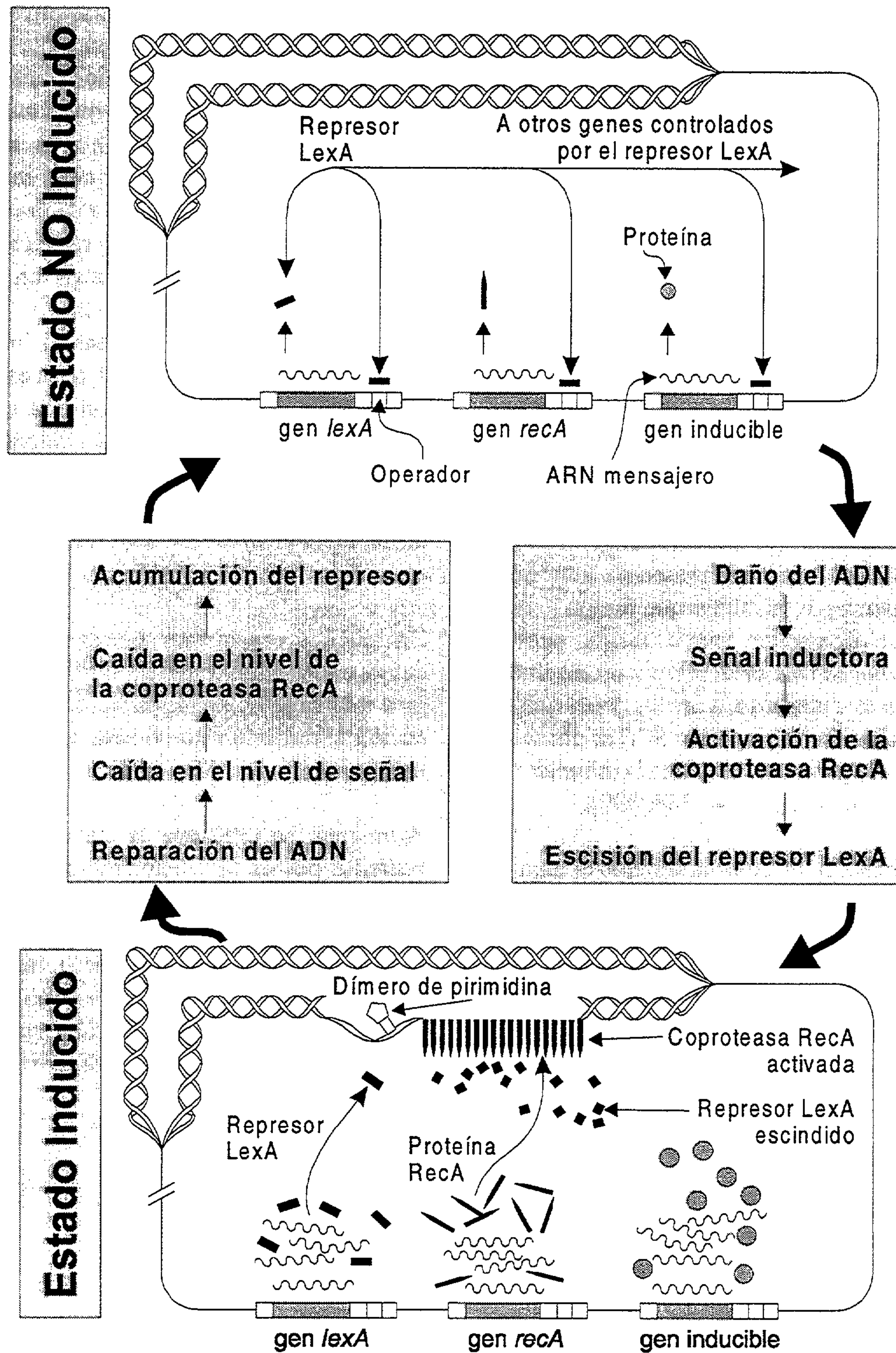


Figura 5.1.- Sistema de reparación del ADN en *Escherichia coli* (respuesta SOS) [144].

Las consecuencias fisiológicas de la inducción de la respuesta SOS incluyen la inhibición de la división celular y el aumento de la reparación del ADN [144, 388, 390]. La inducción de la respuesta SOS incrementa la supervivencia de la célula dañada o bien RecA podría proteger la hendidura creada en el ADN del ataque de la exonucleasa RecBC. El efecto inhibitorio de las quinolonas en la ADN girasa puede originar una disminución de la capacidad de la célula para reparar su ADN dañado o una filamentación celular continua que por sí misma puede ser letal para la célula. La implicación de la respuesta SOS en el efecto de la quinolona a nivel de la célula bacteriana es tal que mutantes deficientes en la inducción de la respuesta SOS sobrevivieron mejor en presencia de quinolonas. Asimismo, mutantes que fueron incapaces de desarrollar filamentación también sobrevivieron mejor en presencia de quinolonas. En este contexto, entre los genes que son inducidos con la respuesta SOS se encuentra *SulA* (*sfiA*), cuyo resultado es la inhibición de la división celular [144, 388, 390].

Asimismo, se ha demostrado que el fenotipo resistente a quinolona del mutante *gyrA* está influenciado por mutaciones en el gen *recA*. En este sentido, se ha propuesto que la proteína RecA podría estar implicada en procesos de reparación del daño en el ADN inducido por quinolonas [144].

Un método para conocer rutas bacteriolíticas es el reciente aislamiento de un mutante de *Escherichia coli* tolerante a quinolonas. Esta cepa, aunque inhibida por quinolonas, es 1000 veces menos susceptible a la acción bactericida comparada con la cepa salvaje. En la localización cromosómica de las mutaciones responsables de esta tolerancia se han identificado las proteínas que juegan un papel en la muerte celular por quinolonas.
Entre estos mutantes se encuentran los que presentan mutaciones tipo *hipA* de la especie *Escherichia coli*, que presentan una mayor tolerancia a antibióticos β-lactámicos y a quinolonas, lo que sugiere una posible ruta común en la acción bactericida de ambos, quizá implicando mecanismos que participan en la división celular [491].

En muchos organismos procariotas se ha demostrado la inducción de respuesta fisiológica o la síntesis de nuevas proteínas por la acción de radiación ultravioleta, que también induce la respuesta SOS en *Escherichia coli*.

Asimismo, se sabe que la mayoría de las bacterias poseen un sistema regulatorio SOS muy relacionado con el descrito en *Escherichia coli*, entre las que se incluyen *Salmonella typhimurium*, *Proteus mirabilis*, *Haemophilus influenzae*, *Caulobacter crescentus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis* [144, 388, 390].

4 - MECANISMOS DE RESISTENCIA A QUINOLONAS

La resistencia a quinolonas se origina fundamentalmente por mutaciones en el cromosoma bacteriano.
Algunas quinolonas son metabolizadas y modificadas en las células eucariotas, pero todavía no existen evidencias de una modificación-desactivación como mecanismo de defensa en la célula bacteriana.

En muchas especies bacterianas es relativamente fácil aislar mutantes con alto nivel de resistencia al ácido nalidíxico mediante un simple escalón selectivo, pero es bastante más difícil lograrlo con las fluoroquinolonas. La alta resistencia al ácido nalidíxico mediante un simple escalón ocurre con una frecuencia de 10^{-7}, mientras que mediante un único escalón selectivo se obtienen mutantes con un escaso nivel de resistencia a las nuevas quinolonas con una frecuencia de 10^{-9}.
Mediante uno o varios escalones selectivos podemos obtener mutantes en el laboratorio, con altos niveles de resistencia a fluoroquinolonas, y que presentan una resistencia cruzada a otras quinolonas. De este modo se han seleccionado cepas de *Escherichia coli* con fenotipo de múltiple resistencia a antimicrobianos y alto nivel de resistencia a norfloxacina, con una frecuencia de 10^{-7} [140].
De todas formas, y generalmente, los resultados de selección *in vitro* permiten alcanzar altos niveles de resistencia que no se suelen alcanzar con tanta facilidad en aislamientos clínicos directos.

Así, en el IV Simposium Internacional de nuevas quinolonas celebrado en Munich en 1992 [338] se evaluó la actividad de la ofloxacina frente a bacterias gramnegativas y grampositivas de pacientes no hospitalizados. Después de su utilización en Alemania durante 7 años, la ofloxacina continuaba inhibiendo el crecimiento del 97% de las bacterias gramnegativas del 93% de las bacterias grampositivas. En dicho certamen, Tabuko comunicó una disminución de la susceptibilidad a quinolonas en Japón de un 20-30% en los aislados clínicos de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Citrobacter freundii* (periodo 1990-1991 *versus* 1985-1986) [338].
Asimismo Jones y Hoban, también en el mismo año, comunicaron que la ofloxacina inhibió entre el 87% y el 90% de los organismos grampositivos y gramnegativos; encontrándose con cepas resistentes de las especies *Klebsiella pneumoniae, Serratia marcescens* y *Providencia* spp.; mientras que en *Staphylococcus* y *Pseudomonas aeruginosa* se observó resistencia cruzada para todas las fluoroquinolonas, tanto de uso hospitalario como extrahospitalario [338].
Igualmente, Fu *et al.* comunicaron en dicho año varios casos de diarreas causadas por *Shigella* y *Salmonella* que respondieron al tratamiento con norfloxacina [338].

El estudio realizado en España durante diez años, desde 1983 hasta 1992, sobre resistencia a quinolonas en *Escherichia coli* causante de infecciones del tracto urinario, concluyó informando de que el ácido pipemídico pasó de presentar un 6% de cepas resistentes antes de 1989 a un 16,2% en 1991 y a un 18% de cepas resistentes en 1992 [380]. La susceptibilidad al ácido nalidíxico sólo se estudió hasta 1988 observándose un rango de resistencia ligeramente mayor que para el ácido pipemídico. El aumento de resistencias al ácido pipemídico y otras quinolonas en *Escherichia coli* en los últimos años parece ser una consecuencia del frecuente uso de las fluoroquinolonas. De 1988 a 1992 las resistencias a norfloxacina han aumentado doblán-

dose cada año. La proporción de resistencias a norfloxacina y ciprofloxacina fue de un 5,4% y un 4%, respectivamente, en 1991 y de un 8,4% y 7,1%, respectivamente, en 1992. Para la mayoría de estas cepas resistentes, la CMI de la norfloxacina fue mayor o igual a 32 µg/ml y la de la ciprofloxacina fue mayor o igual a 16 µg/ml. También se observó que las cepas de *Escherichia coli* resistentes a ciprofloxacina son más a menudo resistentes a tetraciclina que las cepas sensibles a ciprofloxacina [380].

En otro estudio realizado en España en 1993, en el que participaron 14 hospitales, se analizó la actividad *in vitro* de la ofloxacina frente a 2.640 aislamientos clínicos, tanto grampositivos como gramnegativos: 1.387 enterobacterias, 407 bacilos gramnegativos no fermentadores (BNF), 583 estafilococos, 91 estreptococos y 172 enterococos. Las CMIs se determinaron mediante la técnica de microdilución en caldo o de dilución en agar. La sensibilidad a ofloxacina fue la siguiente: enterobacterias 93,4%, BNF 68,8%, estafilococos 82,8%, estreptococos 96,7%, enterococos 58,1%. El porcentaje global de resistencia a la ofloxacina fue del 14,7%. La CMI_{90} frente a enterobacterias fue de 0,5 µg/ml, frente a estreptococos fue de 1 µg/ml, frente a estafilococos de 8 µg/ml y frente a enterococos de 64 µg/ml [12].

En otro estudio realizado posteriormente en España en 1995, en el que participaron 18 hospitales españoles, se indicó que la resistencia a la ciprofloxacina en 1.804 cepas de enterobacterias fue del 6% [156].

El interés clínico creciente por las fluoroquinolonas ha fomentado el desarrollo de numerosos estudios *in vitro* sobre las bases moleculares de la resistencia a quinolonas, realizados fundamentalmente en cepas de *Escherichia coli*. Las mutaciones resistentes descritas han sido agrupadas en:

<table>
<tr><td>1) Mutaciones que afectan a las subunidades de la ADN girasa bacteriana, la diana intracelular de las 4-quinolonas y/o a la topoisomerasa IV</td><td colspan="3">[57, 64, 75, 101, 115, 116, 117, 118, 120, 121, 138, 140, 162, 195, 216, 217, 218, 311, 312, 326, 350, 366, 367, 368, 385, 418, 440, 448, 470, 472, 483, 505]</td></tr>
<tr><td rowspan="3">2) Mutaciones que disminuyen la acumulación de la quinolona:</td><td rowspan="2">a) Defectos en la permeabilidad de la membrana externa:</td><td>alteraciones en las proteínas</td><td>[75, 97, 140, 191, 203, 219, 297, 329, 423]</td></tr>
<tr><td>alteraciones en el LPS *</td><td>[64, 113, 124, 203, 503]</td></tr>
<tr><td>b) Participación del transporte transmembrana protón-dependiente</td><td colspan="2">[165, 233, 272, 273, 293, 345, 346, 348, 370]</td></tr>
</table>

* No todos los autores están de acuerdo en que influye en la acumulación de quinolonas.

<table>
<tr><th colspan="4">TABLA 40.- TIPOS DE RESISTENCIA A QUINOLONAS EN ESCHERICHIA COLI Y EN OTRAS ENTEROBACTERIAS. LOCALIZACIÓN DE LOS GENES Y FENOTIPOS [140].</th></tr>
<tr><th>Tipo de resistencia</th><th colspan="2">Gen, localización en el mapa y fenotipo</th><th>Bibliografía</th></tr>
<tr><td rowspan="3">Mutaciones en la ADN girasa y/o en la topoisomerasa IV</td><td colspan="2">gyrA (48 min): nfxA, nalA, cfxA</td><td>[57, 75, 101, 115, 116, 117, 118, 120, 121, 135, 140, 187, 194, 195, 202, 216, 217, 218, 254, 311, 326, 335, 350, 359, 384, 385, 387, 414, 418, 440, 448, 470, 472, 483, 505]</td></tr>
<tr><td colspan="2">gyrB (83 min): nalC, nalD</td><td>[75, 119, 135, 163, 194, 202, 217, 218, 248, 335, 385, 413, 472, 496, 505]</td></tr>
<tr><td colspan="2">parC y parE</td><td>[26, 27, 57, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 135, 195, 218, 350, 384, 385, 413, 414, 433, 470, 483]</td></tr>
<tr><td rowspan="9">Mutaciones que disminuyen la acumulación de la droga</td><td rowspan="8">Reducción de la permeabilidad</td><td>nfxB (19 min)</td><td>[57, 219, 221]</td></tr>
<tr><td>nalB (cfxB) (34 min)</td><td>[180, 219, 220]</td></tr>
<tr><td>nfxC</td><td>[219]</td></tr>
<tr><td>mar</td><td>[8, 89, 96, 164, 168, 180, 221, 232, 258, 259, 269, 298, 321, 355, 357, 509]</td></tr>
<tr><td>ramA</td><td>[164]</td></tr>
<tr><td>alteraciones en las proteínas</td><td>[75, 97, 135, 191, 203, 219, 297, 326, 329]</td></tr>
<tr><td>alteraciones en el LPS de la membrana externa</td><td>[64, 113, 124, 203, 326, 503]</td></tr>
<tr><td>Otros</td><td>[18, 135, 316, 324, 329, 462]</td></tr>
<tr><td colspan="2">Participación del transporte transmembrana protón-dependiente</td><td>[135, 165, 233, 272, 273, 292, 293, 301, 305, 345, 346, 348, 370]</td></tr>
<tr><td>Otros</td><td colspan="2">icd, cya, crp</td><td>[496]</td></tr>
</table>

4.1 - MUTACIONES QUE AFECTAN A LA ADN GIRASA BACTERIANA

4.1.1 - PAPEL DE LA ADN GIRASA EN EL METABOLISMO BACTERIANO

El mecanismo de resistencia bacteriana a quinolonas más importante es de tipo cromosómico y consiste en la modificación enzimática de la subunidad A de la ADN girasa [75, 101, 140, 162, 216, 217, 218, 312, 326, 385, 418, 440, 448, 470, 471, 472, 505]. Dicha ADN girasa, también llamada topoisomerasa II bacteriana, es una enzima esencial para la bacteria y responsable del superenrollamiento de la doble banda del ADN. Su estructura es tetramérica, y está compuesta por dos subunidades A y dos subunidades B [75, 218, 311]. La subunidad A tiene una función de relajación de la doble hélice de ADN y una función adicional, cuando se asocia a la subunidad B, de estrangular y cerrar la doble hélice.

La subunidad B contiene una zona para la hidrólisis del ATP, que proporciona la energía necesaria para el superenrollamiento y es la diana de la novobiocina y de la coumermicina (antibióticos bacteriostáticos). La ADN girasa convierte la energía libre del ATP en energía de torsión y de superenrollamiento [75, 218].

La ADN girasa es conocida como la diana de las quinolonas desde que Gellert *et al.* [162] identificaron en 1977 el producto de *nalA*, el primer gen de resistencia a quinolonas descrito en *Escherichia coli*, como un componente de la ADN girasa [75]. La diana de las quinolonas es diferente de la diana de la novobiocina y la coumermicina, aunque ambas son componentes de la ADN girasa, no existiendo resistencia cruzada entre quinolonas y coumermicina en mutantes *nalA*. Por su parte, la relajación del superenrollamiento del ADN en mutantes *nalA* es inhibida por el ácido oxolínico, debido a que la subunidad A de la ADN girasa es la diana de las quinolonas [75, 162, 312].

4.1.1.1 - Consecuencias de la alteración de la subunidad A (GyrA)

El papel determinante de la subunidad A de la ADN girasa en la sensibilidad de dicha enzima a las quinolonas se demuestra porque la alteración de la subunidad A aumentó la ID_{50} (concentración de quinolonas necesaria para inhibir la síntesis del ADN en un 50%) de 2 a 500 veces en *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. También aumentó la IC_{50} (concentración de quinolonas necesaria para inhibir el superenrollamiento plasmídico por la girasa en un 50%) de 25 a 500 veces para la girasa de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus vulgaris*, *Enterococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa* [75].

Los genes *gyrA* y *gyrB* se localizan en el cromosoma bacteriano y están implicados en la síntesis de la ADN girasa. La naturaleza de las mutaciones en la girasa A responsable de la resistencia a las quinolonas fue caracterizada inicialmente en cuatro cepas resistentes de *Escherichia coli* K12, dos de ellas seleccionadas con ácido nalidíxico y dos con ácido pipemídico [140], comprobándose que el alto nivel de resistencia se asoció a una simple sustitución de la serina de la posición 83 por triptófano o leucina. Asimismo, un bajo nivel de resistencia se asoció a la sustitución de la alanina de la posición 67 por una serina, o bien una glutamina en la posición 106 por histidina [140, 218, 338]. También se ha demostrado en *Escherichia coli* que la doble mutación resultante de la sustitución de los

aminoácidos serina en la posición 83 y ácido aspártico en la posición 87 producen un mayor incremento en los valores de las CMIs de las fluoroquinolonas que cuando sólo se produce una mutación [385, 472]. Por tanto, todas las mutaciones que conducen a resistencia a las quinolonas se localizan en una región proteica de la girasa A cercana al residuo catalítico Tyr-122 cuya función es antagonizada por las quinolonas. Esta región N-terminal de la proteína de la girasa A forma un dominio compacto resistente a la acción de proteasas y que parece contener el lugar activo para la rotura del ADN y la acción de la quinolona [140, 218]. De este modo, para *Escherichia coli* está claro que una mutación puntual en el gen *gyrA* que causa la sustitución de la serina en posición 83 (u otro aminoácido en su vecindad) es responsable de la modificación de la subunidad A y conduce a una disminución de afinidad de la ADN girasa por las quinolonas. Resultados similares fueron descritos para *Staphylococcus aureus* por otros autores en 1990 [75]. Muchos de los trabajos sobre las modificaciones de la subunidad A incluyen experimentos de complementación con *gyrA* que consisten en la introducción de un plásmido con un alelo tipo sensible del gen *gyrA* en las cepas resistentes a quinolonas. Estos experimentos han confirmado que las cepas de diferentes especies de bacterias grampositivas y gramnegativas resistentes a quinolonas tienen mutaciones en genes *gyrA*. En concreto, en bacterias gramnegativas, diferentes trabajos han demostrado este hecho en *Escherichia coli* [75, 217, 218, 335, 385, 418, 470, 472, 505], *Pseudomonas aeruginosa* [75, 101, 102, 140, 162, 216, 217, 218, 312, 385, 418, 440, 448], *Salmonella typhimurium* [163, 182, 194, 384, 385], *Klebsiella pneumoniae* [115, 116, 117, 118, 305, 483], *Citrobacter freundii* [350, 483], *Enterobacter cloacae* [117, 118, 120, 121, 483], *Providencia stuartii* [483], *Acinetobacter baumanii* [471], y *Serratia marcescens* [254, 308, 483].

4.1.1.2 - Alteración de la subunidad B

Yamagishi *et al.* [496] fueron los primeros en demostrar que una mutación en la girasa B también podría conferir resistencia a quinolonas en *Escherichia coli* [75, 119, 163, 194, 202, 248, 330, 335, 385, 413, 496, 505]. Las dos primeras cepas, descritas en 1981, expresaban la resistencia en los genes *nalC* y *nalD*. Más tarde se publicó que *nalC* era la girasa B con una transformación de adenina a guanina en la primera base del codon 447, conduciendo a la sustitución del residuo del ácido glutámico por lisina en la posición 447. También se comprobó que *nalD* era la girasa B con una transformación de guanina en adenina en la primera base del codon 426, conduciendo a la sustitución del residuo de asparagina por ácido aspártico. El mutante *nalD* era resistente, con un aumento en las CMIs de los ácidos nalidíxico, piromídico y pipemídico de 10 veces; también era menos susceptible a las fluoroquinolonas que la cepa origen. El mutante *nalC* era resistente a las quinolonas ácidas como el ácido nalidíxico, ácido piromídico y flumequina, pero muy susceptible a quinolonas anfóteras, con una disminución de 4 veces su CMI al ácido pipemídico y a las fluoroquinolonas. Este hecho se justifica por la modificación de la carga y la hidrofobicidad de la molécula, cuyo resultado era el de afinidades diferentes para las fluoroquinolonas, en particular aquéllas con carga positiva cerca del núcleo de la piperazina. Los 13 mutantes de *Escherichia coli* KL-16 con modificación en la subunidad B, del estudio referido, tenían mutaciones en los codones 426 o 447 [75, 505].

En pocas cepas bacterianas resistentes a quinolonas han sido identificadas mutaciones en el gen *gyrB* [75, 119, 163, 194, 202, 248, 330, 335, 385, 413, 496, 505]. Un trabajo reciente ha estudiado los efectos de la introducción de un gen *gyrB* salvaje clonado de *Escherichia coli* en un plásmido en el interior de los mutantes caracterizados de *Escheri-*

chia coli nal-24 y *nal*-31 [496] y en un aislado clínico de *Salmonella typhimurium* [194]. Este trabajo demostró que la introducción del gen *gyrB* en el interior de *Escherichia coli nal*-24 redujo 5 veces la CMI del ácido nalidíxico. Para *Escherichia coli nal*-31 la CMI se redujo 3 veces. Aunque los valores de CMI de la ciprofloxacina también disminuyeron en presencia del gen *gyrB* salvaje, el efecto no fue tan pronunciado como en el caso del ácido nalidíxico. En un aislado clínico de *Salmonella typhimurium* se introdujeron ambos genes salvajes *gyrA* y *gyrB*, solos y combinados. Únicamente en presencia de ambos genes la sensibilidad del aislado fue similar a la de una cepa del género *Salmonella* sensible a quinolonas, lo cual sugiere que las mutaciones en ambos genes contribuyeron al fenotipo de resistencia [385].

4.1.1.3 - Alteración del acoplamiento de la molécula quinolónica a la ADN girasa por mutaciones en los genes *gyrA* y *gyrB*

El exacto lugar de unión para la quinolona aún no se conoce, aunque considerando las mutaciones observadas en el gen *gyrA* es posible que la **región determinante de resistencia a quinolonas** (QRDR) sea el dominio proteico de la girasa A, que incluye los aminoácidos 67 al 106.
Este dominio está localizado cerca de Tyr-122 y tiene una unión covalente al ADN durante el giro y cierre en el proceso de superenrollamiento. La mayoría de las mutaciones del gen *gyrA* ocurren alrededor del codon 83 y la resistencia debida a sustituciones de la serina-83 se atribuyen a la pérdida del grupo hidroxilo de la misma. Así, las sustituciones de la serina por triptófano y leucina en posición 83 confieren mayores niveles de resistencia que la sustitución por la alanina.
Parece probable que la sustitución del pequeño grupo hidroxilo de la serina por los grupos hidrofóbicos voluminosos de la leucina y del triptófano conduce a una obstrucción física para la unión de las quinolonas a la hendidura enzimática. De igual modo, otra mutación frecuente es la sustitución del ácido aspártico en posición 87 por ácido glutámico o asparagina [369, 483].
Se ha sugerido que la hendidura enzimática es creada después de la formación del complejo ADN girasa y que es el lugar de unión para las quinolonas. Esta localización es equivalente al "bolsillo" de las quinolonas propuesto por Yoshida en 1991 [505], que incluye el dominio de aminoácidos del 67 al 106 en la girasa A y el dominio de aminoácidos del 426 al 447 en la girasa B. Este modelo explicaría el que los cambios en la estructura de este bolsillo o hendidura alteren la alta o baja afinidad de la quinolona por la ADN girasa [75].

4.1.1.4 - Mutaciones en *parC* y *parE*

También se han descrito resistencias a quinolonas debidas a mutaciones en la topoisomerasa IV. Esta enzima ha sido descrita tanto en *E. coli* como en *Salmonella typhimurium*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterim tuberculosis* y otros.

La topoisomerasa IV, al igual que la ADN girasa, es una topoisomerasa tipo II y, de la misma forma, está constituida por dos pares de subunidades A y B, formando un tetrámero A_2B_2.
Tanto en *Escherichia coli* como en *Streptococcus pneumoniae* estas subunidades son denominadas ParC y ParE y están codificadas por los genes *parC* y *parE*, en cambio en *Staphylococcus aureus* las subunidades son denominadas GyrlA y GyrlB y están codificadas por los genes *grlA* y *grlB*.
El papel principal de esta enzima parece estar en el desencadenamiento de los replicones

hijos que proceden de la replicación del ADN, aunque también puede actuar en la relajación del superenrrollamiento de dicho ADN. Esta enzima presenta una secuencia de aminoácidos similar a la de las correspondientes subunidades de la ADN girasa, ocurriendo la mayor homología en la región $-NH_2$ terminal que es la región que determina la resistencia a las quinolonas (región QRDR).
De igual modo, las mutaciones más frecuentes originan la sustitución de la serina en posición 80 por isoleucina o arginina, y la del ácido glutámico en posición 84 por lisina [26, 135, 263, 433, 470].
Esta similaridad implica que las quinolonas pueden ser capaces de inhibir tanto a la ADN girasa como a la topoisomerasa IV. De hecho Pen y Mariang han demostrado que las quinolonas inhiben la actividad de relajación de la topoisomerasa IV a concentraciones de 3 a 30 veces mayores que las requeridas para inhibir la misma actividad en la ADN girasa.

De igual manera parece ser que el blanco principal para las quinolonas en *E. coli* es la ADN girasa, en tanto que la topoisomerasa IV actúa como blanco secundario. En cambio tanto en *Streptococcus pneumoniae* como en *Staphylococcus aureus* ocurre al contrario, siendo el blanco principal para las quinolonas la topoisomerasa IV, en tanto que la ADN girasa actuaría como blanco secundario [138, 331].
Asimismo, los altos niveles de resistencia a quinolonas en *E. coli* se han asociado a la presencia simultánea de mutaciones en *gyrA* y *parC* [26, 27, 115, 116, 117, 118, 120, 121, 138, 195, 311, 350, 366, 367, 368, 433, 470, 472, 483].
De igual forma ciertos autores relacionan los altos niveles de resistencia a quinolonas en *E. coli* con una mutación conjunta en los genes *gyrA* y *parE* [57], en tanto que otros no encuentran esa relación [413].

4.2 - IMPORTANCIA DE LA PERMEABILIDAD DE LA MEMBRANA EXTERNA

4.2.1 - PAPEL DE LOS COMPONENTES DE LA MEMBRANA EXTERNA EN LA ENTRADA DE LAS MOLÉCULAS DE QUINOLONAS EN LA CÉLULA BACTERIANA

Otro mecanismo de resistencia a quinolonas es debido a una disminución en la entrada de la quinolona en la célula bacteriana y/o un aumento en el transporte transmembrana protón-dependiente. En las bacterias gramnegativas, el camino de penetración de las quinolonas en la bacteria es mediante difusión pasiva a través de la membrana externa y, preferentemente, a través de los canales de las porinas, vía que utilizan la mayoría de los compuestos hidrofílicos, mientras que los compuestos hidrofóbicos penetran mejor atravesando la bicapa lipídica.
Aunque difundan en parte a través de las porinas, no es imposible que pueda existir un paso a través de la capa lipídica después de la desestabilización de los puentes de magnesio que enlazan las moléculas de LPS. Asimismo, a nivel de la membrana citoplásmica, difunden pasivamente hacia el interior de la célula [340].
Las principales dianas de los antimicrobianos están localizadas por dentro de la membrana externa de la bacteria, teniendo que atravesarla para ser efectivos, por lo que la susceptibilidad de las bacterias gramnegativas a un antimicrobiano está influenciada por las propiedades de permeabilidad de los canales presentes en la membrana externa.
Las proteínas de la membrana externa (porinas, de canal específico y otras) que pueden encontrarse en las cepas relacionadas con este estudio, se detallan en las tablas correspondientes del capítulo 2.
En *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, se han descrito dos porinas mayores, la

OmpC y la OmpF. En *Enterobacter cloacae* las porinas principales son las OmpF y OmpD, en tanto que en *Klebsiella pneumoniae* se han descrito la OmpK36 [6, 7, 21, 129, 199, 200, 201, 307], la OmpK35 [127, 199] y la OmpK37 [127]. En *Proteus vulgaris* y *Citrobacter freundii* y *Citrobacter diversus* las porinas halladas no han sido aún caracterizadas [340, 384, 385].

4.2. 2 - ALTERACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA EXTERNA Y DEL LPS EN *ESCHERICHIA COlI*

Las principales porinas de membrana externa (Omp) en *Escherichia coli* son la porina F (OmpF) y la porina C (OmpC), cuya expresión depende de estímulos ambientales como temperatura y osmolaridad. La entrada de las quinolonas en la célula se produce mediante difusión pasiva que no requiere energía.

En *E. coli* las mutaciones en la expresión de las proteínas de la membrana externa afectan más a menudo a la síntesis de la porina F, lo que confiere sólo un ligero aumento de la CMI a quinolonas. El primer gen descrito en *E. coli* que confería resistencia a quinolonas por descenso de la permeabilidad fue *nalB*. Posteriormente han sido descritos en *E. coli* otros genes como son *nfxB*, *cfxB*, *norB* y *nfxC*, que también confieren resistencia a quinolonas por disminución de la expresión de la porina F y, en consecuencia, de la permeabilidad de la membrana. Esta disminución de la expresión de la porina F se ha descrito en mutantes Mar en donde el gen responsable *marA* aumenta la expresión del gen *micF*, que, codificado por un ARN inverso del ARNm de la OmpF, da lugar a una inhibición postranscripcional del gen *ompF* y la ausencia de síntesis de la OmpF [17, 75, 89, 122]. Ésto provoca en ciertos mutantes una resistencia cruzada entre antimicrobianos no relacionados estructuralmente con las quinolonas como las tetraciclinas, el cloranfenicol y, en cierta medida, las β-lactaminas. Curiosamente tales mutantes resistentes a las quinolonas pueden ser seleccionados por la tetraciclina o el cloranfenicol con una frecuencia 1000 veces superior que por las quinolonas. Esta resistencia cruzada de las quinolonas con otros antimicrobianos se ha encontrado también en otras especies bacterianas seleccionadas *in vivo* e *in vitro* como *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Salmonella paratyphi A*, *Pseudomonas aeruginosa* y *P. cepacia* [340, 342].

Estudios con mutantes deficientes en porinas sugieren que las quinolonas hidrofílicas como ciprofloxacina y norfloxacina penetran a través de la porina F [97, 140, 297, 329].

También se ha descrito que los mutantes *nfxB* y *cfxB* de *Escherichia coli* disminuyen la expresión de la porina de membrana externa OmpF y la acumulación de norfloxacina en las células por un mecanismo dependiente de energía. En este caso, la reducción de la permeabilidad a la quinolona en ambos mutantes ha sido atribuida a la disminución de la difusión a través de los canales porinas y a un sistema de transporte transmembrana protón-dependiente [165, 233, 272, 273, 293, 345, 346, 348, 370].

En otras enterobacterias, se ha comprobado una pérdida o descenso en la expresión de proteínas de la membrana externa de entre 35 y 41 KDa, que corresponden a las porinas de *Enterobacter cloacae*, *Proteus vulgaris*, *C. freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, [233, 294, 430] *Serratia marcescens*, *Salmonella paratyphi* A y *Salmonella typhimurium* [75, 385, 387].

Sin embargo en mutantes de *Salmonella typhimurium*, los pequeños aumentos en los valores de las CMIs de quinolonas en las células deficientes en porinas comparadas con las cepas sensibles, sugieren que existe una ruta adicional de entrada para quinolonas hidrofóbicas como el ácido nalidíxico, para el que la capa de LPS forma una barrera

permeable. En este sentido, se ha propuesto que las quinolonas, a través de su grupo carbonilo, quelan iones magnesio asociados a los LPS produciéndose la unión de las moléculas de LPS entre sí y desestabilizando de esta forma la membrana externa, dejando expuesta la bicapa de lípidos a través de la cual las quinolonas son capaces de difundir [83, 140], aunque no todos los autores están de acuerdo en el papel del LPS en la resistencia a quinolonas.

4.3 - PAPEL DEL TRANSPORTE TRANSMEMBRANA PROTÓN-DEPENDIENTE EN LA RESISTENCIA A QUINOLONAS

A nivel de la membrana citoplásmica, las quinolonas, difunden pasivamente hacia el interior de la célula. Este paso va a ser contrarrestado para las fluoroquinolonas por un mecanismo de transporte transmembrana protón-dependiente, también llamado de expulsión activa, que tiende a devolver las moléculas del antimicrobiano, que hayan penetrado en el citoplasma, hacia el espacio periplásmico o al exterior de la célula, como resultado de un proceso dependiente de energía en la membrana citoplásmica bacteriana.
En la figura 5.2 se muestra el mecanismo de acción y la estructura propuesta para la mayoría de los complejos de expulsión activa en bacterias gramnegativas. El sistema de transporte protón dependiente consiste en una proteína transportadora específica para cada sustrato, enclavada en la membrana citoplásmica, una proteína de canal específica situada en la membrana externa y una proteína accesoria que hace de unión entre las dos anteriores y que queda situada en el espacio periplásmico [345].
Se han descrito tres grandes familias de proteínas transportadoras protón dependientes: MF, RND y SMR. En *Escherichia coli*, los sistemas transportadores protón-dependientes caracterizados y que confieren resistencias a múltiples drogas, pertenecen sobre todo a la familia MF (proteínas EmrB, Bcr, EmrD, TetA, TetB y TetE), aunque también se han descrito en las familias RND (AcrB, AcrF y YhiV) y SMR (EmrE). En *Salmonella typhimurium* se ha caracterizado la proteína SmvA y en *Salmonella ordonez* la TetD, perteneciente ambas a la familia MF. En *Klebsiella pneumoniae* se ha caracterizado la proteína QacE, perteneciente a la familia SMR. En *Pseudomonas aeruginosa* se han caracterizado las proteínas transportadoras MexB, MexD y MexF pertenecientes a la familia RND y TetC perteneciente a la familia MF [346, 370].
Aún sin caracterizar o sobre sustrato desconocido actúan las proteínas transportadoras homólogas de la SugE: EcSugE (de *E. coli*) CfSugE (de *Citrobacter freundii*) y PvSugE (de *Proteus vulgaris*), todas ellas pertenecientes a la familia SMR.
La proteína EmrB, caracterizada en *E. coli*, es específica principalmente para los sustratos CCCP, ácido nalidíxico, tetraclorosalicilanilida, tiolactomicina y organomercuriales.
Bcr, caracterizada en *E. coli*, es específica para biciclomicina y sulfatiazol.
EmrD, caracterizada en *E. coli*, es específica para desacopladores hidrofóbicos como el CCCP.
TetA, TetB y TetE, caracterizadas en *E. coli*, así como TetC, caracterizada en *Pseudomonas aeruginosa*, y TetD, caracterizada en *Salmonella ordonez*, actúan como transportadores específicos de tetraciclinas.
AcrB, caracterizada en *E. coli*, es específica para acriflavina, violeta cristal, eritromicina, bromuro de etidio, detergentes y decanoato.
AcrF, caracterizada en *E. coli*, sirve como transportadora para acriflavina, actinomicina D y vancomicina [346, 370].
EmrE, caracterizada en *E. coli*, funciona como transportadora para cationes monovalentes como bromuro de cetiltrimetilamonio, violeta cristal, bromuro de etidio, violeta de metilo, tetraciclinas, eritromicina y sulfadia-

zina.

SmvA, caracterizada en *Salmonella typhimurium*, es específica para bromuro de etidio y violeta de metilo.

QacE, caracterizada en *Klebsiella pneumoniae*, tiene el mismo rango de especificidad que Smr de *S. aureus*, es decir para cationes monovalentes como bromuro de cetiltrimetilamonio, violeta cristal y bromuro de etidio [346, 370].

Otras proteínas transportadoras específicas para quinolonas, entre otros agentes, se han descrito en especies no pertenecientes a la familia de las enterobacterias. Entre ellas podemos destacar:

NorA de *Staphylococcus aureus*, LfrA de *Mycobacterium smegmatis* y Blt y Bmr de *Bacillus subtilis*, todas ellas pertenecientes a la familia MF; Smr de *S. aureus*, perteneciente a la familia SMR; y MexB, MexD y MexF en *Pseudomonas aeruginosa*, pertenecientes a la familia RND [370].

Las proteínas transportadoras de la familia SMR no se encuentran asociadas con otras proteínas en su labor de expulsión, cosa que sí suele ocurrir con las de las familias MF y RND.

Las proteínas transportadoras de la familia SMR se encuentran situadas en la membrana citoplásmica y actúan extrayendo las moléculas de sustrato desde el interior del citoplasma y expulsándolas hacia el periplasma. Sin embargo las proteínas transportadoras de las familias MF y RND se encuentran asociadas con otras proteínas, como se puede apreciar en la figura 5.2, lo que hace que el flujo del sustrato se canalice hacia el exterior celular a través de la proteína accesoria periplásmica que la une con la correspondiente proteína de canal de la membrana externa [346].

En concreto, la proteína transportadora EmrB está asociada con la proteína accesoria EmrA, formando el complejo EmrAB, que a su vez está unido a la proteína de canal TolC.

Del mismo modo ocurre con la proteína transportadora AcrB que está asociada con la proteína accesoria AcrA, formando el complejo AcrAB, que a su vez está unido con otra proteína de canal TolC.

La proteína transportadora YhiV está asociada con la proteína accesoria YhiU, formando el complejo YhiUV, que a su vez está unido con una proteína de canal desconocida [346, 370].

Los fármacos anfifílicos atraviesan la membrana externa (a menudo a través de los canales de las porinas), y se insertan parcialmente en la bicapa de la membrana citoplasmática. El transportador captura éstas moléculas de fármaco en la bicapa y los bombea hacia afuera, atravesando la barrera de la membrana externa. Para agentes que cruzan rápidamente la membrana de citoplasmática, el transportador deberá ser capaz de aceptar sustratos provenientes tanto del citoplasma como de la bicapa.

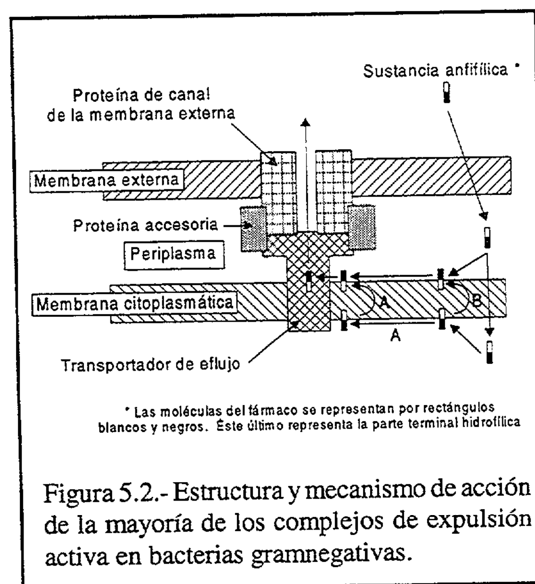


Figura 5.2.- Estructura y mecanismo de acción de la mayoría de los complejos de expulsión activa en bacterias gramnegativas.

El aumento del transporte transmembrana protón-dependiente en mutantes resistentes a quinolonas es una causa importante de resistencia, debido a la disminución de la acumulación de la droga.

Si la energía para el transporte transmembra-

na o expulsión activa es suministrada por un gradiente electroquímico de protones, como por ejemplo la fuerza motriz protónica (PMF) con que funcionan la mayor parte de los sistemas de expulsión activa, un sustrato para el transporte de electrones como el lactato o el NADH, podría estimular el transporte dentro de las vesículas. Este transporte energético también podría ser inhibido por sustancias que bloquean el transporte electrónico como el cianuro o por agentes que despolarizan la membrana energética como el 2, 4-dinitrofenol (DNP) o el CCCP. El CCCP destruye el gradiente de pH favoreciendo la acumulación de las fluoroquinolonas [135, 203, 348, 383].

El ATP también puede estimular el transporte en el interior de las vesículas creando PMF por la vía F_0F_1 ATPasa. Los inhibidores de la ATPasa, como la N,N'-diciclohexilcarbodiimida o las sustancias que inhiben o destruyen el gradiente electroquímico de protones como el DNP o el CCCP, podrían inactivar el transporte PMF-dependiente [272]. Sin embargo, en algunos sistemas de transporte el ATP puede actuar directamente sobre el transportador de proteínas. En ese caso, la captación de la droga dependiente de ATP no se ve afectada por inhibidores del transporte electrónico o por PMF cuando la captación se lleva a cabo mediante sistemas de vesículas de membrana [272].

El grado de resistencia conferida por el aumento del transporte transmembrana [75] es menor que la resistencia causada por una mutación *gyrA*. Sin embargo, el incremento en el transporte activo de una droga al exterior de la célula bacteriana podría contribuir notablemente a multiplicar el nivel de CMI de la quinolona, frente a una cepa que además tenga alguna mutación en la ADN girasa y por tanto al fracaso terapéutico.

Recientemente, se ha evidenciado la existencia de diferentes sistemas de expulsión activa codificados cromosómicamente en diferentes especies de enterobacterias como el sistema AcrAB en *E. coli* entre cuyos sustratos se encuentran el ácido nalidíxico y otros antimicrobianos como la tetraciclina, el cloranfenicol, la ampicilina, la rifampicina [357] además de la acriflavina y otros como la cefalotina [274, 292, 293, 357] y cuya expresión parece jugar un papel importante en mutantes con fenotipo de múltiple resistencia a antimicrobianos (*mar*) de *E. coli* [357]. En estos mutantes se ha descrito recientemente un incremento en la expresión de los genes *acrA* y *acrB* [293] así como que la bomba de expulsión activa AcrAB juega un papel principal en la resistencia a antibióticos en mutantes Mar de *Escherichia coli* [357]. Estos mutantes Mar comparten similitud con los mutantes *cfxB* y *nfxB*, pero también exhiben otros cambios en la membrana externa además de bajos niveles de la proteína de membrana externa OmpF. Es de destacar que las cepas que expresan mutaciones tipo *norB* y *cfxB* tienen muchas similitudes fenotípicas con las expresadas en mutaciones que afectan a *marA*. Asimismo, se ha descrito que las cepas que tienen mutaciones en *marA* pueden alcanzar altos niveles de resistencia a quinolonas con gran frecuencia, por mutación en el locus *gyrA*, ya que es frecuente en mutantes con altos niveles de resistencia a fluoroquinolonas la existencia de múltiples mutaciones [64, 75, 101, 140, 162, 216, 217, 218, 312, 326, 355, 385, 418, 440, 448, 470, 472, 505]. De hecho Hooper *et al.* (1987) [220] encontraron cepas resistentes a quinolonas con mutaciones que afectan a la girasa A y a la permeabilidad [75, 97, 140, 191, 203, 217, 297, 329, 385, 418]. Estas mutaciones múltiples se han descrito en otras especies de enterobacterias como *Klebsieblla* sp, *Enterobacter cloacae* y *Citrobacter freundii* [115, 116, 117, 118, 120, 121, 140, 191, 195, 350, 483].

5 - FARMACOCINÉTICA

Absorción

Las fluoroquinolonas se absorben de forma variable por vía oral; algunas lo hacen de forma completa, como pefloxacina, fleroxacina, trovafloxacina, ofloxacina, levofloxacina y lomefloxacina, con una gran biodisponibilidad (mayor del 95%), mientras que ciprofloxacina, enoxacina, norfloxacina y grepafloxacina lo hacen de forma incompleta, con una biodisponibilidad que oscila entre un 69% y un 88% [50, 211, 400].

La concentración plasmática máxima se consigue entre una y tres horas después de una dosis oral. La concentración máxima y el área bajo la curva concentración-tiempo aumenta en proporción lineal a la dosis, y es independiente de la vía de administración. Tras la administración de dosis múltiples, no existe acumulación significativa de estos agentes en suero o en tejidos corporales [2, 112, 475].

La absorción de las fluoroquinolonas puede ser interferida por los antiácidos orales que contengan sales de aluminio o de magnesio. Los alimentos, sobre todo los lácteos, disminuyen la absorción oral de todas las fluoroquinolonas [338], alterando la concentración máxima [475]. Por ello, las fluoroquinolonas deberían ser administradas en ayunas y nunca con productos que contengan hierro, magnesio, aluminio o calcio ya que todas estas sustancias reducen enormemente la absorción oral [338]. La ofloxacina y la trovafloxacina [9, 22] son las fluoroquinolonas que menos interacción presentan con las sustancias mencionadas [153].

Distribución

Las fluoroquinolonas tienen actividad bactericida dependiente de la concentración, con niveles superiores a su CMI, y producen un significativo efecto postantibiótico [212].

El comportamiento farmacocinético de las diferentes fluoroquinolonas varía en la absorción y eliminación, y es muy similar en la distribución. Esta última, y en relación directa con la liposolubilidad de la estructura química, condiciona que los niveles tisulares sean muy elevados con respecto a los plasmáticos, incluso en tejidos habitualmente vetados a otros grupos de fármacos. La distribución sigue un modelo tricompartimental [475]. Las fluoroquinolonas se concentran en el tejido gastrointestinal (especialmente la trovafloxacina) [9, 22], en el genitourinario (especialmente la esparfloxacina, enoxacina y norfloxacina) en el tracto respiratorio (especialmente la ciprofloxacina, grepafloxacina, ofloxacina y levofloxacina). Como consecuencia de las concentraciones que alcanzan en macrófagos y polimorfonucleares, los tejidos infectados tienen mayor concentración del fármaco que los tejidos normales. Las concentraciones de algunas de las fluoroquinolonas son inexplicablemente más bajas en embarazadas que en mujeres normales, aunque atraviesan la barrera placentaria y se concentran en el líquido amniótico. Además, en la leche materna las concentraciones exceden del 75% de las del suero, dos horas después de la administración del fármaco [475]. La pefloxacina puede alcanzar concentraciones terapeúticas en el líquido cefalorraquídeo. La unión a proteínas, factor impor-

tante para la distribución en los tejidos, oscila entre el 14% y el 25% para norfloxacina, ofloxacina, pefloxacina y lomefloxacina; es del 30% para ciprofloxacina y levofloxacina, del 32% para la fleroxacina, del 35% para la enoxacina y del 50 % para la grepafloxacina. Esta baja proporción es la responsable de su fácil penetración en los tejidos. Sin embargo, la trovafloxacina [9, 22] y la rufloxacina tienen una unión a proteínas plasmáticas de un 76 y un 80%, respectivamente, superiores a otras fluoroquinolonas [2, 50, 112, 211, 400].

Eliminación: Metabolismo y Excreción

La eliminación de las fluoroquinolonas varía de unas a otras. En tanto que la pefloxacina presenta una metabolización hepática de 85-90%, la trovafloxacina es excretada en un 50% por la bilis sin alterar y en un 43% por las heces [2, 9, 22]. La norfloxacina se metaboliza hepáticamente en un 25% y el resto se excreta a partes iguales sin metabolizar por la orina y las heces. La ofloxacina y levofloxacina se eliminan por la orina sin metabolizar en un 85%, aunque otros autores también incluyen la esparfloxacina. La ciprofloxacina se excreta en un 60% por la orina sin metabolizar y el resto sufre un proceso de metabolización hepática. La grepafloxacina sufre metabolización hepática del 60% y un 27% se excreta por vía fecal [2, 50, 112, 211, 400, 475].

La vida media de eliminación de las fluoroquinolonas es en general prolongada, oscilando entre las 4 horas (ciprofloxacina y norfloxacina), 8 horas (temafloxacina, lomefloxacina y levofloxacina), 11 horas (trovafloxacina), 7-14 horas (pefloxacina y fleroxacina), 18-20 horas (esparfloxacina), y 30 horas (rufloxacina). Este hecho implica que el intervalo de administración debe ser de al menos 12 horas. En la insuficiencia renal, la concentración máxima y el área bajo la curva concentración-tiempo podría aumentar de una a diez veces para todas las fluoroquinolonas, excepto para la pefloxacina. La hemodiálisis elimina una proporción de la dosis de fluoroquinolonas, aunque a pesar del acortamiento pasajero de la vida media de eliminación, no es necesario incrementar la dosis. Como el aclaramiento peritoneal es bajo, el ajuste de dosis no es necesario en pacientes con diálisis peritoneal ambulatoria continua [2, 112, 475].

Las propiedades farmacocinéticas varían en los ancianos, aumentando la concentración máxima y el área bajo la curva concentración-tiempo, debido a una disminución del metabolismo de primer paso (proceso de biotransformación en el hígado), a la administración concomitante de medicamentos que alteran la motilidad gástrica, así como a una menor eliminación renal. Sin embargo, no está justificado corregir sistemáticamente la dosis en ancianos, debiendo ajustarse según el grado de disfunción hepática y renal [2, 112, 475].

6 - TOXICIDAD

Las fluoroquinolonas son en general bien toleradas pero presentan algunos efectos tóxicos peculiares como los articulares y neurológicos. La relación de cada uno de estos efectos en el conjunto de efectos adversos que pueden presentar las quinolonas se recogen en la tabla 41.

La toxicidad sobre el cartílago articular, descubierto en la investigación en animales y común a la totalidad de las fluoroquinolonas, ha supuesto que estos fármacos hayan sido proscritos cuando existe gestación o incluso en edad de crecimiento. No obstante, su uso es cada vez más frecuente en niños con infecciones complicadas [475]. Se han comunicado casos aislados de artralgias, artritis y tendinitis en pacientes tratados con las fluoroquinolonas antiguas o recientes, sin que se hayan descrito factores predisponentes, de escasa trascendencia clínica y reversibles al suspender el tratamiento[2, 112, 145].

La neurotoxicidad ya había sido descrita con los primeros componentes de la familia de las fluoroquinolonas y, al parecer, está relacionada con la capacidad de producir un efecto antigabérgico. La neurotoxicidad se manifiesta por agitación, depresión, euforia y confusión mental. En casos aislados se han observado alteraciones de la visión, oído, gusto y olfato. Suelen aparecer asociados casi siempre con un factor de predisposición como edad avanzada, arterioesclerosis cerebral, epilepsia o tumor cerebral. La neurotoxicidad no es dosis dependiente y aparece con mayor frecuencia con la administración intravenosa, incluso después de la primera dosis. Por lo tanto, las fluoroquinolonas están contraindicadas en pacientes con epilepsia y en general

Tabla 41.- NOTIFICACIONES ESPONTÁNEAS DE SOSPECHAS DE REACCIONES ADVERSAS CON QUINOLONAS AL SISTEMA ESPAÑOL DE FARMACOVIGILANCIA [145]

	AN	AP	Nor	Cip	Enx	Ofx	Pfx
Piel	2 (13)*	67 (39)	64 (32)	155 (29)	22 (47)	28 (16)	4 (11)
Gastrointestinal	6 (40)	50 (29)	49 (24)	114 (22)	7 (15)	32 (19)	11 (31)
S. Nervioso	2 (13)	26 (15)	32 (16)	63 (12)	11 (23)	24 (14)	3 (9)
General	2 (13)	6 (4)	14 (7)	31 (6)	1 (2)	7 (4)	2 (6)
Psiquiátrico	0	5 (3)	8 (4)	40 (8)	4 (8)	48 (28)	3 (9)
Musculoesquelético	0	3 (2)	7 (3)	54 (10)	0	10 (6)	12 (34)
Hígado	0	0	6 (3)	13 (2)	1 (2)	2 (2)	0

* Entre paréntesis el porcentaje respecto al total. Nor = Norfloxacina
AN = Ácido nalidíxico AP = Ácido pipemídico Cip = Ciprofloxacina
Ofx = Ofloxacina Enx = Enoxacina Pfx = Pefloxacina

en pacientes con lesiones del sistema nervioso central. Se debe evitar el consumo de alcohol así como conducir o manejar maquinaria peligrosa, por la pérdida de reflejos que pueden provocar [2, 112, 145, 475].

La intolerancia digestiva (común al resto de los antibacterianos) es poco frecuente y se manifiesta con náuseas, vómitos, diarreas, pérdida de apetito y dolor abdominal. Estos efectos son transitorios y dependiente de la dosis, y son raros con la administración intravenosa. Si durante o después del tratamiento la diarrea es persistente, se debe descartar la colitis pseudomembranosa [145].

Entre los fenómenos alérgicos se debe destacar la fotosensibilidad, asociada sobre todo al uso de norfloxacina, ofloxacina, enoxacina y fleroxacina [50, 211, 400, 475] [145].

Las reacciones alérgicas cutáneas son muy poco frecuentes, suelen ser leves y desaparecen al suspender el tratamiento. Aunque se han publicado muy pocos casos de reacción anafiláctica después de la primera dosis, las fluoroquinolonas están contraindicadas en pacientes con historia de hipersensibilidad a algún miembro de la familia [145].

Se han descrito casos de hipotensión y de taquicardia dosis-dependiente.

En unos pocos casos se ha asociado la terapia con fluoroquinolonas a ictericia colestática y hepatitis, pero no se ha observado hepatotoxicidad irreversible.

La nefrotoxicidad es excepcional; la cristaluria se ha observado en pacientes que recibieron dosis altas de norfloxacina o ciprofloxacina cuando el pH de la orina, que normalmente es ácido, se había elevado a más de 7,3, con lo que se redujo la solubilidad de las fluoroquinolonas. Como precaución, los pacientes deben tomar suficientes liquidos para asegurar la diuresis.

Las dosis moderadas de fluoroquinolonas no producen efectos mutagénicos.

La toxicidad oftalmológica, a pesar de estar descrita en animales de experimentación, es muy poco frecuente en humanos [2, 112, 145, 475].

La fluoroquinolona más tóxica es la temafloxacina que fue retirada del mercado en junio de 1992, después de la detección de un número elevado de casos de hipoglucemia y de procesos graves de hemólisis, la mitad asociados a insuficiencia renal y alteraciones hepáticas [145].

La última quinolona retirada del mercado debido a su toxicidad hepática, aunque no existe bibliografía al respecto, ha sido la trovafloxacina y su profármaco alatrofloxacina. Fueron autorizadas por la Comisión Europea en julio de 1998 y en España se comenzó su comercialización en diciembre de 1998. Desde que se autorizó su uso en Estados Unidos se han producido 152 casos documentados de alteraciones hepáticas graves, 9 con desenlace fatal o trasplante hepático. Debido a la posibilidad de aparición de reacciones hepáticas graves e impredecibles, no pudiéndose identificar medidas preventivas, y existiendo alternativas terapéuticas válidas, el Comité de Especialidades Farmacéuticas Europeo ha considerado que el balance beneficio/riesgo es negativo, recomendando la suspensión de autorización de comercialización que la Agencia Española del Medicamento decidió hacer efectiva a partir del 15 de junio de 1999 [125].

7 - INTERACCIONES

Las interacciones con mayor trascendencia clínica son las que se producen con antiácidos, teofilina, fembufeno y warfarina [2, 50, 112, 211, 400, 475].

La absorción gastrointestinal de todas las fluoroquinolonas orales disminuye con la administración simultánea de antiácidos que contengan aluminio o magnesio, y de preparaciones que contengan calcio, hierro y zinc. La disminución de la absorción puede ser de hasta 70 veces. Para evitar este efecto, no se deben administrar las fluoroquinolonas hasta después de 2 a 4 horas de la administración de estos medicamentos.

La ciprofloxacina, la enoxacina, la pefloxacina y la tosufloxacina, son inhibidores potentes de la enzima citocromo P450, responsable del metabolismo de las metilxantinas como teofilina y cafeína. La administración concomitante de fluoroquinolonas puede, además de prolongar la vida media de la teofilina, elevar la concentración en suero de ésta e incrementar sus efectos adversos. Han sido publicadas reacciones fatales como fallo cardíaco, estado epiléptico e insuficiencia respiratoria. La ciprofloxacina, la enoxacina, y la norfloxacina producen un aumento de la toxicidad de la cafeína, por lo que es aconsejable evitar durante la terapia con estas fluoroquinolonas el consumo de café, té, chocolate y refrescos de cola [145].

Algunas fluoroquinolonas como enoxacina, norfloxacina y ofloxacina, aumentan a dosis altas los efectos de los anticoagulantes orales, por lo que se recomienda monitorizar los tiempos de coagulación en estos pacientes [2, 112].

8 - INDICACIONES Y USOS

Las fluoroquinolonas desempeñan un papel terapéutico importante en casi todas las infecciones. En general son eficaces en cualquiera de los procesos que puedan producir algunos de los microorganismos sensibles a la acción de estos fármacos [2, 112].

En procesos agudos y crónicos otorrinolaringológicos, en especial en la otitis externa maligna, pueden considerarse de indicación casi electiva. De igual modo, en la reagudización de la bronquitis crónica y de la fibrosis quística y las bronquiectasias. Las infecciones del tracto urinario, complicadas o no, suponen en su conjunto una de las indicaciones más claras, al igual que las infecciones osteoarticulares causadas por bacilos gramnegativos.

Las infecciones intestinales producidas por algunas enterobacterias pertenecientes al género *Salmonella* y *Shigella* pueden ser tratadas con fluoroquinolonas.

Para el manejo de la fiebre neutropénica, en muchos hospitales se utiliza la combinación de un aminoglucósido con un β-lactámico con actividad antipseudomonas. Sin embargo, debido a la nefrotoxicidad producida por esta combinación, se han desarrollado nuevas fluoroquinolonas para evaluarlas en estos pacientes. También pueden ser efectivas para

la esterilización selectiva del tracto digestivo (por ejemplo, para erradicar la flora aeróbica y preservar la flora normal anaeróbica importante para la defensa del huésped) y así prevenir la infección en pacientes neutropénicos [475].

La norfloxacina se utiliza en infecciones del tracto urinario, y en la diarrea infecciosa [2, 112, 338, 475]. La utilización profiláctica de las fluoroquinolonas orales es cada vez más frecuente. La norfloxacina administrada el día después de una intervención quirúrgica puede reducir las infecciones urinarias asociadas a sondajes [297].

La ciprofloxacina fue aprobado para el tratamiento por vía oral de las infecciones del tracto urinario, infecciones respiratorias (por ejemplo, exacerbaciones de bronquitis bacteriana) y neumonías producidas por *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae.* También se ha utilizado como tratamiento de infecciones de la piel y de transmisión sexual como el chancro sifilítico y la infección uretral por *Neisseria gonorrhoeae,* diarreas debidas a patógenos susceptibles como bacterias del género *Salmonella* y *Shigella*, y en osteomielitis por *Pseudomonas aeruginosa. In vitro*, la ciprofloxacina es la fluoroquinolona más activa frente a *Pseudornonas* spp. demostrando tener actividad frente a *Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas cepacia, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas putrefaciens* y *Pseudomonas stutzeri,* con una CMI-90 que oscila entre 0,25 y 4 mg/l [2, 112, 475].

Las nuevas fluoroquinolonas penetran bien en los tejidos ginecológicos, siendo recomendadas en la enfermedad inflamatoria pélvica. La ciprofloxacina combinada con metronidazol ha producido mejores resultados que la combinación cefoxitina-doxiciclina en el tratamiento de esta afección [475]. La utilización profiláctica de las fluoroquinolonas orales es cada vez más frecuente; una dosis única de 500 mg de ciprofloxacina es tan efectiva como un tratamiento de 5 días en la profilaxis masiva de portadores en la infección por meningococo [297].

La ofloxacina es útil para el tratamiento de las infecciones del tracto urinario, infecciones de la piel e infecciones respiratorias, al igual que la ciprofloxacina. También se considera apropiada como tratamiento para enfermedades de transmisión sexual, aunque han aparecido cepas resistentes de *Neisseria gonorrhoeae.* Es tan eficaz como la doxiciclina en erradicar a *Chlamydia trachomatis* administrada por vía oral durante 7 días, aunque otros autores consideran a la esparfloxacina más efectiva.

Asimismo, se ha utilizado en el tratamiento de infecciones prostáticas pero no es tan eficaz en osteomielitis ni en diarreas. La ofloxacina se ha utilizado en infecciones de prótesis de cadera y se ha observado que produce concentraciones activas frente a la mayoría de las bacterias que causan infecciones postoperatorias en estos pacientes.

Algunos estudios han demostrado que la combinación de una fluoroquinolona (ciprofloxacina u ofloxacina) con piperacilina, es más efectiva en el tratamiento de la fiebre neutropénica que la combinación de un aminoglucósido con un β-lactámico o con vancomicina [50, 211, 400, 475].

La lomefloxacina se usa en dosis única diaria en infecciones del tracto urinario, exacerbaciones de bronquitis causadas por *Haemophilus influenzae* y en la profilaxis de los procedimientos urológicos en Alemania [475].

La enoxacina sólo se utiliza en infecciones del tracto urinario y en la gonorrea [475].

La temafloxacina se ha utilizado para el tratamiento de infecciones del tracto urinario, bronquitis bacteriana, neumonías causadas

por *Streptococcus pneumomae* e infecciones de la piel. Algunos pacientes tratados con temafloxacina desarrollaron hemolisis, trombocitopenia, insuficiencia renal aguda e incluso ha ocasionado la muerte. La incidencia de eventos tóxicos es de aproximadamente 1:5.000 a 1:10.000 pacientes, aunque no se encontraron complicaciones en 4.000 casos sometidos a vigilancia por la *"Food and Drug Administration"* [338] ni en el estudio de 2.602 casos de Pernet (1991) [377].

La pefloxacina se ha usado en infecciones respiratorias, cutáneas, urinarias y óseas. Se ha descrito la eficacia de la ciprofloxacina y de la pefloxacina en el tratamiento de la osteomielitis [208, 215, 236, 338, 450].

Se ha demostrado que una dosis única de 800 mg de pefloxacina produce altas concentraciones urinarias durante más de 7 días [338]. Sin embargo, para infecciones no complicadas del tracto urinario en mujeres jóvenes, la administración de una dosis única de cualquiera de las fluoroquinolonas podría ser efectiva si se usa durante 3 días. La pefloxacina y la enoxacina atraviesan con más facilidad las meninges inflamadas que la ciprofloxacina y la ofloxacina, y su acción es selectiva frente a *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis*. Sin embargo, en los casos de meningitis se siguen usando los antibióticos β-lactámicos [2, 112, 475].

La esparfloxacina es una de las fluoroquinolonas más recientes. Es más activa *in vitro* frente a bacterias grampositivas que la ciprofloxacina y la ofloxacina [77]. La esparfloxacina y la tosufloxacina son los inhibidores más potentes de *Staphylococcus aureus,* con una CMI_{90} menor o igual de 0,6 mg/l [147, 475], siendo más potentes que el imipenem, la cefotaxima, la gentamicina y el cotrimoxazol. La esparfloxacina es la fluoroquinolona más activa frente a *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis* [338, 475] y *Mycobacterium avium* [338]. También tiene excelente actividad frente a *Chlamydia trachomatis* [338]. Es la más potente *in vitro* frente a *Neisseria* spp. y *Branhamella catarrhalis,* con una CMI_{90} menor de 0,015 mg/l. Al igual que la lomefloxacina y la tosufloxacina, inhibe el crecimiento *in vitro* de *Haemophilus ducreyi* (CMI_{90}< 0,03 mg/l) [475]. Es la fluoroquinolona más activa frente a *Legionella* spp. incluyendo *Legionella pneumophila.* Finalmente, la esparfloxacina junto a la ciprofloxacina y la tosufloxacina, es la fluoroquinolona más potente frente a *Listeria monocytogenes*.
La clinafloxacina posee una actividad frente a *Pseudomonas aeruginosa* superior a ciprofloxacina.

8.1 - INDICACIONES EN LA INFANCIA Y COMO PROFILAXIS QUIRÚRGICA

Las fluoroquinolonas podrían ser apropiadas para el tratamiento de infecciones en niños. El uso de la resonancia magnética ha hecho posible determinar si las fluoroquinolonas producen cambios en el cartílago articular como ocurre en perros pequeños. Sin embargo, en cientos de niños tratados no se han observado hasta ahora efectos adversos [2, 112]. Las fluoroquinolonas se pueden usar en niños en el tratamiento de exacerbaciones bacterianas en la fibrosis quística, infecciones del tracto respiratorio superior e inferior debidas a *Pseudomonas aeruginosa,* osteomielitis debida a ese mismo microorganismo o a bacilos aeróbicos gramnegativos, diarrea debida a especies del género *Shigella* y, ocasionalmente, para la prevención de la meningitis meningocócica [475].

Datos recientes sugieren que las fluoroquinolonas como ciprofloxacina, norfloxacina, lomefloxacina y ofloxacina son efectivas en prevenir infecciones recidivantes o postoperatorias urológicas, colorrectales, biliares y ginecológicas [62, 100, 107, 252, 420, 475].

8.2 - USOS EN VETERINARIA Y ALIMENTACIÓN ANIMAL

Además de su gran importancia en el consumo humano, se ha extendido el uso de las quinolonas en veterinaria como aditivos a piensos, aparte de su indicación en medicina animal.
El empleo de antimicrobianos en animales de compañía tiene fines fundamentalmente terapéuticos y a veces profilácticos, mientras que en los animales productores de alimentos también se pueden utilizar como promotores del crecimiento añadiéndolos al pienso y al agua de bebida de animales destinados a la producción de alimentos, en dosis subterapéuticas durante periodos de tiempo relativamente prolongados.

Durante los años 1994, 1995 y 1996, el consumo de quinolonas para uso veterinario, supuso el 15% del consumo total de antimicrobianos para uso animal, siendo el volumen de ventas, en millones de pesetas [126]:

Año =>	1994	1995	1996
Quinolonas inyectables	487	505	556
Quinolonas orales	962	881	896
Total (MPts)	1449	1386	1452

El principal efecto peligroso es, desde el punto de vista sanitario, el desarrollo de resistencias bacterianas, que se pueden extender de unos microorganismos a otros pasando de los animales al hombre, ya que sus ecosistemas bacterianos no están separados. La ruta principal por la que pueden transmitirse las bacterias resistentes de los animales al hombre es el contacto directo con los animales que están siendo tratados o están consumiendo antimicrobianos con el alimento. Pero la carne es la que puede representar el mayor peligro debido a la contaminación por bacterias resistentes del contenido intestinal a la hora del sacrificio [43, 126, 182, 247].
Los países nórdicos han penalizado su utilización, no así nuestro país ni la mayoría de los países desarrollados (la FDA aprueba la utilización de enrofloxacina en medicina animal en julio de 1998). Habrá que cuestionarse y trazar estrategias que aseguren la eficacia terapéutica de estos excelentes fármacos frente a la amenaza de la resistencia bacteriana.

9 - NUEVOS AGENTES

Las primeras fluoroquinolonas que aparecieron tenían una actividad limitada frente a *Streptococcus pneumoniae*. Las nuevas quinolonas, como levofloxacina (Hoechst Marion Roussel), esparfloxacina (Rhône-Poulenc Rorer), grepafloxacina (Glaxo Wellcome) y, recientemente, trovafloxacina (Pfizer), han ampliado su espectro con una mayor actividad *in vitro* frente al neumococo y, además, sobre las cepas de neumococo con resistencia a la penicilina [241]. También poseen actividad frente a patógenos habituales del tracto respiratorio como *Haemophilus influenzae, Moraxella catarrhalis, Legionella pneumophila, Chlamydia pneumoniae* y *Mycoplasma pneumoniae*. Son activas frente a *Neisseria gonorrhoeae, Chlamydia trachomatis, Staphylococcus aureus* y bacterias gramnegativas entéricas, al igual que poseen actividad frente a anaerobios [1, 50, 242, 409, 464, 476]. Su aplicación clínica, dado su espectro, es muy tentadora en el tratamiento de la neumonía adquirida en la comunidad. Son de administración única diaria y presentan un efecto postantibiótico superior al de los macrólidos. La grepafloxacina y la esparfloxacina no se encuentran disponibles para su administración parenteral. La trovafloxacina ha sido la última en aparecer en el mercado (Dic-98) y ha sido retirada recientemente. La trovafloxacina (CP-99.219) es una fluoroquinolona sintética de tercera generación, o de cuarta según otros autores, que se ha empleado tanto por vía oral como intravenosa. Es una 7- (3-azabiciclo (3,1,0) hexilnaftiridona. Esta quinolona tiene una superior eficacia en comparación con otras fluoroquinolonas frente a cocos grampositivos aerobios y sobre todo en las bacterias anaerobias más importantes. La trovafloxacina posee un sustituyente 3-azabiciclo en C-7 y un grupo difluorofenilo en posición N-1 Estas dos características de su molécula implican una aportación importante en lo que se refiere a su acción antibacteriana *in vitro*, en relación con ofloxacina, ciprofloxacina y otras fluoroquinolonas de segunda generación. El sustituyente azabiciclo incrementa la eficacia sobre cocos grampositivos aerobios. El grupo difluorofenilo le confiere su mayor actividad frente a las bacterias anaerobias. La trovafloxacina se muestra muy activa frente a diferentes especies de *Streptococcus*, así como frente a aislamientos de enterococos resistentes a vancomicina, ha mostrado una actividad muy superior a ciprofloxacina en *S. aureus* resistentes a meticilina. La CMI_{90} de trovafloxacina fue ≤ 1mg/l frente a cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina y frente a cepas resistentes a ciprofloxacina. Sin embargo, trovafloxacina y grepafloxacina se han mostrado menos activas que ciprofloxacina frente a *P. aeruginosa*, aunque ambas fueron más activas que ciprofloxacina frente a aislamientos clínicos de *Burkholderia cepacia* y *Acinetobacter* spp. Asimismo, frente a *M. tuberculosis*, trovafloxacina se ha mostrado poco activa a diferencia de ciprofloxacina, ofloxacina y esparfloxacina [154, 155, 242, 276].

La moxifloxacina, gatifloxacina, y clinafloxacina se encuentran aún en ensayo clínico de fase III.

La moxifloxacina (BAY 12-8039) es una nueva fluoroquinolona de cuarta generación que corresponde al ácido 1-ciclopropil-7-[(S,S)-2,8-diazabiciclo(4.3.0)non-8-il]-6-fluoro-8-metoxi-1,4-dihidro-4-oxo-3-carboxílico. Está estructuralmente relacionada con la ciprofloxacina con quien comparte el grupo

ciclopropilo en posicion N-1, con BAY 3118, en lo que se refiere al grupo diazabiciclo en posición C-7, y con la gatifloxacina que también posee un radical metoxilo en posición C-8. El anillo de ciclopropilo proporciona un amplio espectro y gran actividad frente a bacterias gramnegativas aerobias. El grupo metoxilo en C-8 en combinación con el ciclopropano en N-1 incrementa la actividad frente a grampositivos pero el responsable de esta actividad es el sustituyente diazabiciclo. La buena actividad antianaerobia puede relacionarse con la presencia del grupo metoxilo en posición C-8. Este radical también es responsable de su actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*.
Es una fluoroquinolona de amplio espectro que incluye a cepas sensibles y resistentes a penicilinas, cefalosporinas, macrólidos y ciprofloxacina, cuya actividad frente a determinadas bacterias ha sido ya comentada en el apartado *Actividad Antibacteriana* y que se presenta como una nueva quinolona enfocada a las infecciones del tracto respiratorio [49, 50].

La utilización de las fluoroquinolonas en general se ha incrementado y ocupan el cuarto lugar del consumo de antimicrobianos y el tercer lugar en cuanto a gasto [412].

TABLA 41.- QUINOLONAS AUTORIZADAS Y COMERCIALIZADAS [2, 3, 302].

	ESPAÑA	USA	EUROPA
Ácido Nalidíxico	+	+	–
Ciprofloxacina	+	+	+
Enoxacina	+	+	+
Esparfloxacina	–	+	+
Grepafloxacina	–	+	–
Lomefloxacina	–	+	+
Norfloxacina	+	+	+
Ofloxacina	+	+	+
Pefloxacina	+	–	+
Temafloxacina	–	+	–

+ ⇨ Autorizada y comercializada – ⇨ No autorizada ni comercializada

Sección 2

Material y Métodos



6 MATERIAL Y MÉTODOS

1 - **Identificación bacteriana. Medios de siembra.**

2 - **Estudio de susceptibilidades.**
   1 - Test de dilución en agar.
   2 - Test de difusión en agar.

3 - **Selección *in vitro* de colonias resistentes.**

4 - **Estudio de las proteínas de membrana externa.**
   1 - Extracción.
   2 - Cuantificación: Método de Lowry.
   3 - Separación: Electroforesis en geles de poliacrilamida.
   4 - Desecación de geles de poliacrilamida.

5 - **Estudio de densitometría.**

6 - **Estudio de los lipopolisacáridos de la membrana externa.**
   1 - Extracción.
   2 - Resolución: Electroforesis en geles de poliacrilamida.
   3 - Tinción de plata. Técnica de Tsai y Frash.

7 - **Valoración de la acumulación de norfloxacina. Técnica del bioensayo.**
   1 - Técnica de obtención de los sobrenadantes con norfloxacina acumulada por la bacteria.
   2 - Técnica del bioensayo.

8 - **Valoración del efecto de un inhibidor del gradiente protónico.**

9 - **Estudio de detección de mutaciones en la ADN-girasa y topoisomerasa IV.**

10 - **Estudio de los cambios morfológicos mediante tinción de gram.**

11 - **Caracterización de las β-lactamasas.**
   1 - Obtención de los extractos enzimáticos crudos.
   2 - Valoración.

12 - **Estudio estadístico.**

6.1 - IDENTIFICACIÓN BACTERIANA. MEDIOS DE SIEMBRA

6.1.1 - MEDIOS DE IDENTIFICACIÓN

Sistema API 20 E

El sistema API 20 E se utiliza para la identificación de bacilos gramnegativos que pertenezcan a la familia *Enterobacteriaceae*. Está compuesto por 20 microtubos que contienen medios de cultivo en forma deshidratada.

En primer lugar, se reparte unos 5 ml de agua destilada estéril en los tubos de una cámara de incubación y se deposita la galería API 20 E en su interior. Posteriormente, se realiza una suspensión bacteriana, con una o varias colonias iguales, en 5 ml de suero salino estéril, hasta alcanzar una turbidez igual al patrón 0,5 de MacFarland. A continuación, se llenan los cuerpos de los microtubos de la galería API 20 E con la suspensión bacteriana recién preparada. Se deberán rellenar también las cúpulas de los microtubos rotulados con CIT, VP y GEL (citrato sódico, piruvato sódico y gelatina de Kohn). Asimismo, habrá que rellenar con aceite de parafina estéril las cúpulas de los microtubos rotulados con ADH, LDC, ODC, URE y SH_2 (arginina, lisina, ornitina, urea y tiosulfato sódico), para obtener anaerobiosis. El test nº 21 corresponde a la prueba de la citocromo oxidasa, que se realiza mediante tiras comerciales (DIFCO), dando lugar a un color azul oscuro cuando la reacción es positiva.

La galería se incuba a 37 °C durante 18 a 24 horas, se revela con los reactivos adecuados según la tabla de lectura y se identifica el microorganismo por comparación con las Tablas de Identificación.

6.1.2 - MEDIOS DE SIEMBRA

6.1.2.1 - Medios de agar

AGAR DE INFUSIÓN DE CEREBRO Y CORAZÓN EN PICO DE FLAUTA.

La composición del medio, en gramos por litro de agua destilada, es la siguiente:

AGAR DE INFUSIÓN DE CEREBRO Y CORAZÓN EN PICO DE FLAUTA	
Infusión de cerebro de ternero	200 g
Infusión de corazón de vaca	250 g
Proteasa peptona	10 g
Dextrosa	2 g
Cloruro sódico	5 g
Fosfato disódico	2,5 g
Agar	15 g
(Suministrado por DIFCO)	

Se utilizó como medio de conservación de las cepas durante un periodo de tiempo de 1 a 2 meses a una temperatura de 4-8 °C. Se resuspendieron 52 g del medio deshidratado por litro de agua destilada y se calentaron hasta su total disolución. Se repartieron en cantidades alícuotas de 10 ml en tubos de cierre hermético y se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. A cada tubo con los 10 ml de medio de cultivo, aún sin solidificar, se le añadió una concentración subinhibitoria de ceftazidima, lomefloxacina o norfloxacina, según el mutante que se desease preservar. Posteriormente, se situaron sobre una superficie inclinada para que tomaran

forma en pico de flauta hasta que el medio solidificó. Cada uno de los diferentes tubos preparados se inoculó con una colonia de cada uno de los mutantes (provenientes de un cultivo previo de 24 horas crecido en medio con antimicrobiano). Los tubos inoculados se mantuvieron a 37 °C, durante 18-24 horas. Una vez crecidas las cepas, se guardaron a una temperatura de 4 °C.

AGAR DE MACCONKEY

La composición del medio, en gramos por litro de agua destilada, es la siguiente:

AGAR DE MACCONKEY	
Peptona	17 g
Proteasa peptona	3 g
Lactosa	10 g
Sales biliares	1,5 g
Cloruro sódico	5 g
Agar	13,5 g
Rojo neutro	0,03 g
Cristal violeta	0,001 g
pH 7,1 a 25 °C	
(Suministrado por DIFCO)	

El agar de MacConkey es un medio selectivo diferencial de cultivo en el que los organismos no fermentadores de la lactosa forman colonias incoloras y transparentes [24].

Este medio se utilizó en placas de Petri estériles de 10 cm de diámetro. En algunos casos se incorporaron al medio concentraciones subinhibitorias del antimicrobiano de selección, para preservar las cepas mutantes.

El medio se preparó disolviendo 50 gramos del medio deshidratado por litro de agua destilada, calentándolo hasta su completa disolución y esterilizándolo en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Posteriormente se dejó enfriar en un baño maría hasta los 50 °C. Entretanto se incorporaron, en su caso, a las placas de Petri las disoluciones de antibiótico, necesarias para preservar las cepas mutantes. Finalmente se distribuyó el medio en dichas placas de cultivo y se dejaron solidificar sobre una superficie horizontal nivelada.

AGAR DE MUELLER HINTON

La composición del medio, en gramos por litro de agua destilada, es la siguiente:

AGAR DE MUELLER HINTON	
Infusión de carne de vaca	300 g
Bio-case	17,5 g
Almidón	1,5 g
Agar	17 g
Cationes divalentes:	
Ca^{2+}	6,08 mg/l
Mg^{2+}	4,32 mg/l
pH 7,3 a 25 °C	
(Suministrado por DIFCO)	

Es un agar enriquecido utilizado como medio de elección para realizar pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos [24].

El medio se preparó disolviendo 38 gramos de dicho medio deshidratado por litro de agua destilada y calentándolo hasta su completa disolución. Se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Finalmente se distribuyeron volúmenes fijos y determinados del medio en placas de Petri estériles y se dejaron solidificar sobre una superficie horizontal nivelada.

6.1.2.2 - Caldos de cultivo

MEDIO ANTIBIÓTICO Nº 3

La composición del medio, en gramos por litro de agua destilada, es la siguiente:

MEDIO ANTIBIÓTICO Nº 3

Extracto de carne de vaca	1,5 g
Extracto de levadura	1,5 g
Peptona	5 g
Dextrosa	1 g
Cloruro sódico	3,5 g
Fosfato dipotásico	3,68 g
Fosfato monopotásico	1,32 g

pH 7 ± 0,05 a 25 °C

(Suministrado por DIFCO)

Este medio fue utilizado en la obtención de los extractos de lipopolisacáridos y proteínas de membrana externa.

El medio se rehidrató disolviendo 17,5 gramos del medio deshidratado por litro de agua destilada. Se distribuyó en matraces o en tubos y, finalmente, se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

INFUSIÓN DE CEREBRO Y CORAZÓN

El caldo de cerebro y corazón es un medio líquido de enriquecimiento [24]. Se preparó disolviendo 37 gramos del medio deshidratado por litro de agua destilada. Fue distribuido en tubos o en matraces y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

La composición del medio, en gramos por litro de agua destilada, es la siguiente:

INFUSIÓN DE CEREBRO Y CORAZÓN

Infusión de cerebro de ternero	200 g
Infusión de corazón de vaca	250 g
Proteasa peptona	10 g
Dextrosa	2 g
Cloruro sódico	5 g
Fosfato disódico	2,5 g

pH 7,4 ± 0,2 a 25 °C

(Suministrado por DIFCO)

CALDO DE MUELLER HINTON

La composición del medio, en gramos por litro de agua destilada, es la siguiente:

CALDO DE MUELLER HINTON

Infusión de carne de vaca	300 g
Bio-case	17,5 g
Almidón soluble	1,5 g

Cationes divalentes:

Ca^{2+}	6,08 mg/l
Mg^{2+}	4,32 mg/l

pH 7,3 ± 0,1 a 25 °C

(Suministrado por DIFCO)

Se utiliza para determinar la susceptibilidad antimicrobiana de microorganismos aeróbicos por el método de dilución [24]. Se preparó disolviendo 21 gramos del medio deshidratado por litro de agua destilada. Fue distribuido en matraces o en tubos y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

CALDO DE MUELLER HINTON CON 15% DE GLICEROL

La composición del medio, en gramos por litro de agua destilada, es la siguiente:

CALDO DE MUELLER HINTON CON 15% DE GLICEROL

Infusión de carne de vaca	300 g
Bio-case	17,5 g
Almidón soluble	1,5 g

Cationes divalentes:

Ca^{2+}	6,08 mg/l
Mg^{2+}	4,32 mg/l

pH 7,3 ± 0,1 a 25 °C
Glicerol al 15%

(Suministrado por DIFCO)

Es utilizado como medio de conservación de las cepas. Se resuspendieron 21 gramos del medio deshidratado por litro de agua destilada. Le fue añadido un 15% de glicerol y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. El medio se repartió en tubos Eppendorf estériles y se inocularon con 100-200 µl del cultivo fresco de 24 horas que se obtuvieron sembrando cada cepa en tubo con caldo de Mueller Hinton. Se congelaron a -70 °C [11, 24, 169].

A continuación, en la tabla 42, se detallan los antimicrobianos utilizados en este estudio y las casas comerciales correspondientes (delegaciones españolas), en tanto que en la tabla 43 se relacionan los reactivos utilizados en este estudio.

TABLA 42.- ANTIMICROBIANOS UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO

Antimicrobianos	Laboratorio
Ácido nalidíxico	Prodes
Ácido pipemídico	Prodes
Amikacina	Normon
Ampicilina	Beecham
Bencilpenicilina	Sigma
Cefazolina	Normon
Cefotaxima	Hoechst
Cefixima	Merck
Cloxacilina	Beecham
Cefoxitina	Merck, Sharp & Dohme
Cefpiroma	Hoechst
Ceftazidima	Glaxo
Ceftizoxima	Smith, Kline & French
Ceftriaxona	Roche
Ciprofloxacina	Bayer
Cloranfenicol	Parke-Davis
Discos estériles	Difco
Esparfloxacina	Rhone-Poulenc Rorer
Gentamicina	Normon
Imipenem	Merck, Sharp & Dohme
Lomefloxacina	G,D Searle & Co
Meropenem	Zeneca Farma
Mezlocilina	Bayer
Netilmicina	Schering-Plough
Norfloxacina	Merck, Sharp & Dohme
Ofloxacina	Roussel
Temafloxacina	Abbott
Tetraciclina	Pfizer
Ticarcilina	Beecham
Tobramicina	Normon

TABLA 43.- REACTIVOS UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO	
Reactivos	**Laboratorio**
Ácido acético	Panreac
Ácido cítrico	Aldrich
Ácido etilen-diamino-tetraacético (EDTA)	Sigma
Ácido peryódico	Panreac
Acrilamida	Sigma
Albúmina de suero bovino (BSA)	Sigma
Almidón soluble	Analar
Azul Brillante (Brilliant blue R250)	Sigma
Azul de bromofenol	Aldrich
Carbonato sódico	C.I.D.
Carbonilcianuro *m*-clorofenilhidrazona (CCCP)	Sigma
Cloruro sódico	Merck
Etanol	Panreac
Fenilmetilsulfonilfluoruro (PSMF)	Sigma
Formaldehído 37%	Sigma
Fosfato de sodio dibásico	Merck
Fosfato de sodio monobásico	Merck
Glicerol	Merck
Glicina	Sigma
Glutaraldehído	Fluka
Hidróxido amónico	Sigma
Hidróxido sódico	Merck
2-mercaptoetanol	Sigma
Metanol	Panreac
N,N'-metilenbisacrilamida	Sigma
Nitrato de plata	Panreac
Persulfato amónico	Sigma
Proteinasa K	Sigma
Reactivo de Folin	Sigma
Sarkosyl (N-lauroilsarcosinato sódico)	Sigma
SDS (dodecil sulfato sódico)	Sigma
Sulfato cúprico	M&B
Tartrato sódico	Carlo Erba
N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED)	Sigma
Trizma base	Sigma
Trizma HCl	Sigma
Yodo	Sigma
Yoduro potásico	Sigma
Urea	Sigma

6.2 - ESTUDIO DE SUSCEPTIBILIDADES A LOS ANTIMICROBIANOS

6.2.1 - TEST DE DILUCIÓN EN AGAR

Esta prueba se utiliza para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) que se define como la concentración mínima de un agente antimicrobiano necesaria para inhibir el crecimiento del microorganismo que se ensaya.

Las diferentes concentraciones de cada antimicrobiano empleado se obtuvieron a partir de una solución inicial con una determinada concentración que se puede representar por 2^n ó $1/2^n$ (siendo n un número entero). A continuación se realizó una dilución seriada cuyo factor de dilución fue de 1/2. El agar de Mueller Hinton, una vez esterilizado, se dejó enfriar en un baño maría hasta los 50 °C. Entretanto se incorporaron a las placas de Petri estériles las distintas diluciones del antimicrobiano. Finalmente se distribuyó el medio en dichas placas de cultivo y se dejaron enfriar y solidificar sobre una superficie horizontal nivelada. Una vez solidificado el agar, las placas se guardaron a 4 °C un máximo de 5 días antes de ser inoculadas con las distintas cepas.

Para la preparación de los inóculos se escogieron una o varias colonias iguales de un cultivo de 24 horas en agar de MacConkey y se diluyeron en 5 ml de suero salino estéril, ajustando la turbidez de la solución a la del patrón nº 0,5 de la escala de sulfato de bario de MacFarland, correspondiendo esta turbidez a un inóculo de $1{,}5 \times 10^8$ UFC/ml.

Las placas de agar con y sin antimicrobiano, utilizadas como control, fueron inoculadas con el replicador de Steer, depositando en cada uno de los 32 inóculos una cantidad final aproximada de 5×10^4 UFC/ml. Las placas se inocularon en orden creciente de concentración de antimicrobiano.

Se siguió el método recomendado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards [336, 493].

La interpretación de las CMIs estándar se realiza conforme a la tabla siguiente (tabla 44) excepto para los antimicrobianos lomefloxacina, temafloxacina, esparfloxacina, cefpiroma y cefuroxima. Para interpretar las CMIs de lomefloxacina, temafloxacina y esparfloxacina se tomó como referencia la CMI de la ciprofloxacina; en tanto que para la interpretación de la CMI de la cefpiroma y de la cefuroxima se tomaron como referencia las CMIs de las cefalosporinas de cuarta generación y la CMI de la cefoxitina respectivamente.

Se utilizaron las siguientes cepas control:

Escherichia coli ATCC 25922, *Citrobacter diversus* T CCUG 14559, *Citrobacter freundii* T NCTC 9750, *Klebsiella pneumoniae* spp. *pneumoniae* ATCC 10031, *Enterobacter cloacae* T ATCC 13047, *Enterobacter cloacae* NCIB 12091, *Enterobacter aerogenes* T DSM 30053, donadas por el profesor Federico Uruburu, Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia; y las cepas *Escherichia coli* JF703 (deficiente en la porina F), *Escherichia coli* JF699 (deficiente en la porina A) y *Escherichia coli* KL16 suministradas por el Dr. L. Derlyn, Genetic Center, United States of America).

TABLA 44.- INTERPRETACIÓN DE LAS CMIS ESTÁNDAR (NCCLS) [336]			
Antimicrobiano	**Resistente CMI ≤**	**Intermedio CMI =**	**Sensible CMI ≥**
Ácido nalidíxico	32	—	16
Amikacina	64	32	16
Azlocilina	128	—	64
Cefalotina	32	16	8
Cefazolina	32	16	8
Cefixima	4	2	1
Cefotaxima	64	16-32	8
Cefoxitina	32	16	8
Ceftazidima	32	16	8
Ceftizoxima	64	16-32	8
Ceftriaxona	64	16-32	8
Cefuroxima	32	16	8
Ciprofloxacina	4	2	1
Cloranfenicol	32	16	8
Gentamicina	16	8	4
Imipenem	16	8	4
Mezlocilina	128	—	64
Netilmicina	32	16	8
Norfloxacina	16	8	4
Ofloxacina	8	4	2
Tetraciclina	16	8	4
Ticarcilina	128	128	64
Tobramicina	16	8	4

6.2.2 - TEST DE DIFUSIÓN EN AGAR

Este ensayo se utilizó para establecer si una cepa concreta es sensible o resistente a un determinado antimicrobiano. La cepa bajo estudio se aplicó a partir de un cultivo en medio líquido, mediante la técnica de barrido de la placa con un hisopo impregnado en dicho medio líquido. Los antimicrobianos se aplicaron en forma de discos de papel de filtro secos. Cuando éstos se dispusieron en la placa de agar inoculada, el disco seco absorbió parte del agua del agar contenido en la placa y la droga se disolvió difundiendo libremente en el medio, creando un gradiente de concentración de la droga infiltrada en el agar que rodea cada disco. Las placas sembradas previamente a este procedimiento, con una determinada cepa, no presentaron crecimiento en aquéllas zonas en las que la concentración del antimicrobiano fue igual o mayor a la concentración mínima inhibitoria para dicha determinada cepa.

El medio de cultivo utilizado fue el agar de Mueller Hinton y se siguió el método recomendado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) [337].

Para la preparación de los inóculos se escogieron una o varias colonias iguales de un cultivo de 24 horas en agar de MacConkey y se diluyeron en 5 ml de suero salino estéril, ajustando la turbidez de la solución a la del patrón nº 0,5 de la escala de sulfato de bario de MacFarland.

Se utilizaron las siguientes cepas control: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Citrobacter diversus* T CCUG 14559, *Citrobacter freundii* T NCTC 9750, *Klebsiella pneumoniae* spp. *pneumoniae* ATCC 10031, *Enterobacter cloacae* T ATCC 13047, *Enterobacter cloacae* NCIB 12091, *Enterobacter aerogenes* T DSM 30053, donadas por el profesor Federico Uruburu, Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia; y las cepas *Escherichia coli* JF703 (deficiente en la porina F), *Escherichia coli* JF699 (deficiente en la porina A) y *Escherichia coli* KL16 suministradas por el Dr. L. Derlyn, Genetic Center, United States of America).

Para inocular el agar se utilizó un hisopo estéril humedecido en la suspensión bacteriana, impregnando de forma homogénea todo el agar. Pasados unos 15 minutos se dispusieron los discos de antimicrobiano y tras unos 30 minutos a temperatura ambiente, para permitir la difusión del antimicrobiano, se incubó durante 16 a 18 horas a 37 ºC [337, 493].

Se midieron los halos en los que no había crecimiento bacteriano y las medidas se interpretaron de acuerdo con las recomendaciones del NCCLS que se detallan a continuación en la tabla 45 [337].

Los discos estériles con antimicrobiano fueron suministrados por DIFCO, a excepción de los discos de esparfloxacina, lomefloxacina y temafloxacina, que se prepararon a partir de soluciones de dichos antimicrobianos con una concentración de 250 mg/l, dispensándose 20 µl (5 µg) en cada disco estéril sin antimicrobiano (DIFCO).

TABLA 45.- INTERPRETACIÓN DE LAS MEDIDAS DE LOS DIÁMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN (NCCLS) [337]

Antimicrobiano	Concentración por disco	Resistente < Ø mm	Intermedio Ø mm	Sensible > Ø mm
Ácido nalidíxico	30 µg	13	14-18	19
Amikacina	30 µg	14	15-16	17
Ampicilina	10 µg	13	14-16	17
Azlocilina	75 µg	17	—	18
Cefazolina	30 µg	14	15-17	18
Cefixima	5 µg	15	16-18	19
Cefotaxima	30 µg	14	15-22	23
Cefoxitina	30 µg	14	15-17	18
Ceftazidima	30 µg	14	15-17	18
Ceftizoxima	30 µg	14	15-19	20
Ceftriaxona	30 µg	13	14-20	21
Cefuroxima	30 µg	14	15-17	18
Ciprofloxacina	5 µg	15	16-20	21
Cloranfenicol	30 µg	12	13-17	18
Cloxacilina	1 µg	19	—	20
Esparfloxacina	5 µg	15	16-20	21
Gentamicina	10 µg	12	13-14	15
Imipenem	10 µg	13	14-15	16
Kanamicina	30 µg	13	14-17	18
Lomefloxacina	5 µg	15	16-20	21
Mezlocilina	75 µg	15	—	16
Netilmicina	30 µg	12	13-14	15
Norfloxacina	10 µg	12	13-16	17
Ofloxacina	5 µg	12	13-15	16
Temafloxacina	5 µg	15	16-20	21
Tetraciclina	30 µg	14	15-18	19
Ticarcilina	75 µg	14	—	15
Tobramicina	10 µg	12	13-14	15

6.3 - SELECCIÓN *IN VITRO* DE COLONIAS RESISTENTES A LAS QUINOLONAS Y A LA CEFTAZIDIMA

A un grupo de 125 cepas, de las aisladas por el Servicio de Microbiología del Hospital Insular de Las Palmas de Gran Canaria, se les realizó un estudio de susceptibilidades mediante pruebas de dilución en agar, frente a 16 antimicrobianos diferentes. De dicho grupo se seleccionaron 18 cepas de tal modo que cumplieran siempre la condición de que la CMI de cualquier fluoroquinolona o de la ceftazidima, frente a estas 18 cepas, fuera como mínimo 8 veces inferior a las CMIs consideradas como valores de resistencia para cada uno de estos antimicrobianos.

Se prepararon placas con antimicrobiano a una concentración 2, 4 y 8 veces el valor de la CMI, y se sembró la cepa de la que queríamos obtener mutantes resistentes. Las cepas a estudiar se sembraron en el medio líquido infusión de cerebro y corazón, y a las 18-24 horas de incubación se hicieron diluciones seriadas 1/10 en 8 tubos preparados de solución salina fisiológica estéril. De las suspensiones bacterianas resultantes de las diluciones $1/10^6$, $1/10^7$ y $1/10^8$ se extendieron 100 µl en placas de medio sin antimicrobiano con objeto de realizar el contaje de colonias para calcular el número de UFC/ml presentes en el inóculo origen. Asimismo, y para continuar con la selección, del inóculo origen de 24 horas de incubación se extendieron 100 µl en nuevas placas con una mayor concentración de antimicrobiano.

El medio utilizado para las placas fue el medio de agar de Mueller-Hinton. Las colonias que crecieron tanto en el agar con antibiótico como en el agar sin antimicrobiano se contaron a las 24, 48 y 72 horas.

La frecuencia de selección se calculó mediante la relación entre el número de colonias desarrolladas en las placas con antimicrobiano y las desarrolladas en las placas sin antibiótico, teniendo en cuenta las diluciones realizadas [428].

6.4 - ESTUDIO DE LAS PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA EXTERNA

6.4.1 - EXTRACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA EXTERNA.

La extracción de proteínas de membrana externa se realizó según el método de Sawai *et al* (1982) [430] pero con algunas modificaciones que se describen a continuación:

A partir de un litro de cultivo bacteriano de cada cepa en Medio Antibiótico nº 3, se realizó la extracción de las membranas externas correspondientes que fueron purificadas tratándola con Sarkosyl (N-lauroilsarcosinato sódico). El extracto de membranas externas se resuspendió en 4,5 ml de Trizma HCl 30 mM (pH 8) conteniendo un 20% de Sarkosyl e incubándolo a 37 °C durante 60 minutos. La suspensión fue centrifugada a 45.000 × g durante 60 minutos a 4 °C. El sedimento fue resuspendido en agua bidestilada estéril y fría, obteniéndose con este procedimiento los extractos conteniendo las proteínas de la membrana externa bacteriana [139, 430].

6.4.2 - CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE EL MÉTODO DE LOWRY

En 1951 Lowry comenzó a utilizar el reactivo de Folin-Ciocalteu para la cuantificación de proteínas empleado generalmente para detectar grupos fenólicos. Este reactivo detecta los residuos de tirosina debido a su naturaleza fenólica, aunque su sensibilidad se mejora añadiendo iones de cobre.

Para establecer la relación entre la absorbancia y la concentración de proteína se realiza una curva de calibrado con un patrón realizado mediante una dilución seriada y a partir de concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino (BSA).

La composición del reactivo de cobre alcalino utilizado en el método de Lowry es la siguiente:

Sulfato cúprico · $5H_2O$	100	mg/l
Tartrato sódico	1	g/l
Carbonato sódico	90	g/l
Hidróxido sódico	18	g/l

Realización

Se mezclan 0,5 ml de reactivo de cobre alcalino con 0,5 ml de la muestra y se dejan reaccionar durante 10 minutos. Se añaden 1,5 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu al 10%, se mezclan bien y se dejan reaccionar durante 30 minutos. Por último se mide la absorbancia a 740 nm [193, 210].

6.4.3 - SEPARACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA EXTERNA MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

La electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS) es la técnica más efectiva para examinar el perfil polipeptídico de fracciones subcelulares.

Se utilizó una cubeta de electroforesis vertical de Techware. El gel se preparó siguiendo la técnica de Ames (1973), con modificaciones en la composición, mediante una combinación de las descritas por Laemmli (1970)

'[266], Neville (1971) y Lugtenberg (1975) [291].

Las soluciones tampón de diferente pH (sistema discontinuo) utilizadas para el gel superior y el gel inferior proporcionan una buena resolución. En el gel superior se consigue un rápido movimiento iónico y las proteínas son comprimidas mediante este movimiento en una delgada banda al mismo tiempo que entran en el gel inferior o de separación, en el cual se retarda el movimiento por las propiedades filtrantes del gel.

La separación de las proteínas de membrana externa se llevó a cabo tanto en geles de poliacrilamida con una concentración del 10% de acrilamida y 0,33% de metilen-bisacrilamida, más dodecil sulfato sódico, como en geles de poliacrilamida con una concentración del 10% de acrilamida con dodecil sulfato sódico y urea 6 M, excepto para la separación las proteínas de membrana externa de Klebsiella pneumoniae que lo fueron en geles de poliacrilamida con una concentración del 11% de acrilamida y 0,55% de metilen-bisacrilamida. La polimerización de los geles se llevó a cabo mediante la presencia de persulfato amónico al 10% y TEMED '[188, 266, 291].

Una cantidad de 10-20 µg de proteínas del extracto se desnaturalizó, mediante calor, en una solución reguladora conteniendo Trizma HCl 0,5 M a pH 6,8; β-mercaptoetanol al 5% '[192] y azul de bromofenol al 0,002%. Tras la desnaturalización de las proteínas se cargaron muestras en los pocillos del gel.

Se utilizaron las siguientes cepas control: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Citrobacter diversus* T CCUG 14559, *Citrobacter freundii* T NCTC 9750, *Klebsiella pneumoniae* spp.*pneumoniae* ATCC 10031, *Enterobacter cloacae* T ATCC 13047, *Enterobacter cloacae* NCIB 12091, *Enterobacter aerogenes* T DSM 30053 (donadas por el profesor Federico Uruburu, Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia); y las cepas *Escherichia coli* JF703 (deficiente en la porina F), *Escherichia coli* JF699 (deficiente en la porina A) y *Escherichia coli* KL16 (suministradas por el Dr. L. Derlyn, Genetic Center, United States of America).

La electroforesis se llevó a cabo a temperatura ambiente usando una corriente constante de 25 a 30 miliamperios por gel. El paso de corriente se detuvo cuando el frente llegó a 1 cm del borde inferior del gel.

La tinción se realizó con Azul Brillante R-250 (Sigma) [266, 291].

6.4.4 - DESECADO DE GELES DE POLIACRILAMIDA

Se lavó el gel desteñido 3 veces durante 15 minutos en agua desionizada. A continuación, se añadió la solución de secado (glicerol al 3 %) agitando suavemente durante 15-20 minutos.

Se incorporaron dos piezas de celofán por gel a la solución de secado y, después de 20 segundos, se colocó una de las piezas de celofán sobre el marco de desecado evitando que se formaran burbujas. Sobre la pieza de celofán se colocó el gel después de haberle cortado los bordes irregulares. A continuación, se incorporó la segunda pieza de celofán sobre el gel, evitando que se formaran burbujas y alisando la superficie con cuidado para no dejar arrugas. Después de drenar el exceso de solución, se colocaron el marco de plástico y las pinzas. Se dispuso el montaje sobre un soporte para el secado durante 48 horas. Una vez seco, se despegó del soporte y se recortó el exceso de celofán [188].

6.5 - ESTUDIO DE DENSITOMETRÍA

Los geles de poliacrilamida con los perfiles electroforéticos de proteínas fueron digitalizados mediante un escáner Mustek MFS 12000SP a una resolución de 600 ppp y una profundidad de 256 niveles de gris para conseguir un archivo gráfico que fue obtenido, guardado y tratado con el programa de gráficos *Micrografx Picture Publisher*.

Dicho archivo gráfico se utilizó como entrada para el programa *Band Leader* (©Ma'ayan Aharoni by Magnitec Ltd.), el cual puede generar tanto un gráfico de intensidades densitométricas como un archivo de datos con dichos valores de densitometría. Estos archivos de datos densitométricos se han importado en la hoja de cálculo *Excel 97* de Microsoft, la cual puede generar tanto un gráfico de intensidades densitométricas más detallado como realizar un tratamiento estadístico de datos. Una muestra del archivo gráfico en *Excel* y su resolución puede verse en la figura 8.13

Posteriormente, con los datos aportados por tres mediciones densitométricas sobre cada proteína mayor en tres geles diferentes, se han calculado los valores densitométricos medios, los cuales se expresan en la tabla 67, tomando como referencia (100%) los valores presentados por las correspondientes cepas origen.

6.6 - ESTUDIO DE LOS LIPOPOLISACÁRIDOS DE LA MEMBRANA EXTERNA

6.6.1 - EXTRACCIÓN DE LOS LIPOPOLISACÁRIDOS DE LA MEMBRANA EXTERNA

Para poder determinar los perfiles de los lipopolisacáridos en extractos crudos de enterobacterias se adaptó el método de Hitchcock y Brown (1983).

Se realizó de la siguiente manera:

1) Las cepas se sembraron en 10 ml de medio líquido Antibiótico nº 3 y se incubaron en agitación continua una noche a 37 °C.

2) Se inocularon volúmenes de 1 ml en 9 ml del mismo medio incubándose a 37° C durante 4 horas.

3) Se centrifugaron volúmenes de 1,5 ml, a 10.000 × g durante 1 minuto, en una centrífuga de tubos Eppendorf.

4) Se desecaron los sedimentos con un papel de filtro y se resuspendieron en 75 µl de buffer de solubilización que contiene:

Dodecil sulfato sódico (SDS) ..	2 g
2-mercaptoetanol	4 ml
Glicerol	10 ml
Azul de bromofenol	1 mg
Trizma HCl 1 M; pH= 6,8 c.s.p.	100 ml

La suspensiones se calentaron a 100 °C durante 10 minutos.

5) Se añadieron 50 µg de proteinasa K disueltos en 15 µl de buffer de solubilización a cada microtubo con las suspensiones y se mantuvieron una noche a 55 °C.

6) Se congelaron a -20 °C hasta su utilización [288, 309].

6.6.2 - RESOLUCIÓN DE LOS LIPOPOLISACÁRIDOS. SEPARACIÓN EN GELES DE POLIACRILAMIDA

La electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) se ha utilizado ampliamente para el estudio de lipopolisacáridos y otras estructuras de la superficie bacteriana. La separación por el sistema discontinuo ha demostrado ser útil para la separación de los lipopolisacáridos de organismos como las enterobacterias.

Se utilizó una cubeta de electroforesis vertical y un sistema de gel discontinuo. Para el gel de separación se utilizó una solución compuesta por acrilamida al 13,5% y metilen-bisacrilamida al 0,25%, con y sin 20 mM de EDTA, y para el gel de entrada de las muestras la misma solución pero al 6% y 0,6% respectivamente y sin EDTA. Asimismo, las muestras de lipopolisacáridos se analizaron siguiendo otra técnica previamente descrita que introdujo como diferencias el uso de un 15% de acrilamida en el gel de separación y 0,5% de dodecil-sulfato-sódico así como 7,5% de acrilamida en el gel de entrada de las muestras [379]. La polimerización se llevó a cabo añadiendo persulfato amónico al 10% y TEMED. El volumen de muestra de extracto de lipopolisacáridos aplicado en los pocillos fue de 30 µl.

Para la separación electroforética se empleó una corriente constante de 35 miliamperios. Se detuvo el paso de corriente cuando el frente quedó a 1 cm del extremo inferior del gel [205, 251, 309, 503].

6.6.3 - TINCIÓN DE PLATA CON LA TÉCNICA DE TSAI Y FRASCH

Los extractos de lipopolisacáridos separados en geles de poliacrilamida fueron teñidos con plata. La tinción se realizó a una temperatura superior a 25 °C para evitar la tinción de proteínas residuales que permanecieron después de la digestión de los extractos por la proteinasa K. La cubeta de cristal utilizada para la tinción del gel fue limpiada previamente con ácido nítrico concentrado y escrupulosamente lavada y aclarada con agua destilada. Al manejar el gel se utilizaron guantes para evitar la aparición de manchas debidas a la presencia de huellas dactilares. Asimismo en todos los pasos, excepto para la fijación, se agitó el gel a una velocidad media de 40 rpm en un agitador orbital.

Los geles fueron teñidos según la técnica de Tsai y Frasch [466] que se describe a continuación:

1) Fijación de los lipopolisacáridos (LPS) en una solución compuesta por 40% de etanol y 5% de ácido acético durante una noche.

2) Oxidación de los LPS durante 5 minutos en una solución compuesta por 0,7% de ácido periódico, 40% de etanol y 5% de ácido acético.

3) Tres lavados de 15 minutos cada uno con agua desionizada.

4) Tinción durante 10 minutos con una solución compuesta por 28 ml de hidróxido sódico 0,1 N, 2 ml de hidróxido amónico concentrado (al 29,4%), 5 ml de nitrato de plata al 20% p/v y 115 ml de agua desionizada.

5) Tres lavados de 15 minutos cada uno con agua desionizada.

6) Revelado con una solución que contenga 50 mg de ácido cítrico y 0,5 ml de formaldehído de 37%, por litro de agua desionizada. Los lipopolisacáridos presentes en el gel comenzarán a aparecer a los 2-5 minutos [205, 466].

7) Parada de la reacción introduciendo el gel durante una hora en una solución de ácido acético al 0,33% en agua desionizada.

8) Conservación del gel en un recipiente con agua desionizada.

6.7 - VALORACIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE LA NORFLOXACINA EN LA CÉLULA BACTERIANA. TÉCNICA DEL BIOENSAYO

Mediante esta técnica se quiere demostrar que la cantidad de norfloxacina acumulada en el espacio intracelular está en función del grado de difusión de dicho fármaco a través de la membrana externa, así como de la influencia de las bombas de expulsión activa a través de la membrana interna. Para ello hemos comparado la acumulación intracelular de la norfloxacina en cepas originales de *Escherichia coli* con la de sus mutantes seleccionados a fluoroquinolonas, tanto en presencia como en ausencia de CCCP (carbonil-cianuro m-clorofenilhidrazona).

El CCCP es una sustancia que despolariza la pared celular bacteriana mediante la inhibición del gradiente protónico, impidiendo el transporte transmembrana protón dependiente [81, 203, 314].

Como cepas control se utilizaron:
E. coli JF703 (deficiente en la porina F) y *E. coli* KL16 (suministradas por Dr. L. Derlyn, Genetic Center, USA).

6.7.1 - TÉCNICA DE OBTENCIÓN DE LOS SOBRENADANTES CON NORFLOXACINA INTRACELULAR ACUMULADA

La técnica utilizada es la empleada por Hirai *et al* en 1986 [203] pero con algunas modificaciones:

Se diluyeron cultivos bacterianos en medio Antibiótico nº 3 de 24 horas con el mismo medio en proporción 1:20 y se incubaron durante 5 horas a 37 °C. A continuación se centrifugaron a 4.000 × g durante 20 minutos y el extracto celular se diluyó en solución reguladora de fosfato 50 mM y pH 7, hasta adquirir una absorbancia espectrofotométrica de 1,5 medida a una longitud de onda de 520 nm. (El número de células viables fue comprobado mediante dilución seriada y siembra de un inóculo en placas de agar). Cada solución bacteriana de absorbancia 1,5 obtenida de esta forma se repartió en una triple serie de tubos estériles, dispensando 8 ml por tubo. El número de tubos de cada serie debe coincidir con el número de intervalos de tiempo, que coincidirán con el número de muestras a obtener, durante el tiempo que dure el ensayo. En nuestro caso, preparamos tres tubos por serie que coincidieron con la separación de las muestras a los 5, 15 y 30 minutos del comienzo del ensayo.

A continuación, a una serie completa, se le añadió CCCP para obtener una concentración final en cada tubo de 50 µM y, a otra serie completa, se le añadió CCCP para obtener una concentración final en cada tubo de 100 µM. Posteriormente, se sumergieron las tres series en un baño maría a 37 °C durante 10 minutos. Pasado este tiempo, se añadió norfloxacina en las tres series de tubos para obtener una concentración final en cada tubo de 10 µg/ml.

A los 5, 15 y 30 minutos de añadir la norfloxacina se tomó un tubo de cada serie y se mantuvieron a 5 °C hasta que se centrifugaron a 4.000 × g durante 20 minutos a 5 °C, recogiendo los sedimentos y desechando los sobrenadantes. Estos sedimentos se resuspendieron con 4 ml solución de tampón fosfato

sódico 50 mM, pH 7 y se volvieron a centrifugar para realizar un lavado extracelular. Esta operación se realizó tres veces. Cada sedimento final así obtenido fue resuspendido en 200 µl de solución de tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7 y se mantuvieron a 100 °C durante 10 minutos. A continuación, se centrifugaron en una centrífuga de tubos Eppendorf durante 10 minutos recogiendo el sobrenadante con la norfloxacina intracelular acumulada. Se congelaron a -20 °C.

6.7.2 - TÉCNICA DEL BIOENSAYO

Los niveles de norfloxacina en los sobrenadantes se determinaron con la técnica del bioensayo por el método de difusión en agar utilizando la cepa *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 [81, 175] (donada por el profesor Federico Uruburu de la Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia).
Del cultivo de una noche en agar de MacConkey se escogieron 4 ó 5 colonias y se sembraron en 10 ml medio Antibiótico n° 3 y se incubaron durante 18 horas. A continuación, se realizaron diluciones 1/10 en suero salino hasta obtener 10^8 UFC/ml. A partir de una solución de norfloxacina de 8 µg/ml se hicieron diluciones progresivas con factor de dilución ½ con el fin de elaborar una curva patrón. Las tres series de diluciones patrón de norfloxacina se prepararon sin CCCP y con CCCP a concentraciones finales de 50 µM y 100 µM.

Las placas de Mueller Hinton se sembraron con un hisopo a partir de la dilución de 10^8 UFC/ml de la cepa control. A continuación, se dispusieron los discos estériles con 20 µl de las sucesivas diluciones patrón de norfloxacina, así como con 20 µl de cada una de las muestras del sobrenadante intracelular recogido. Se incubaron durante 18 horas a 37 °C y tras ese tiempo se midieron los halos de inhibición.

Los resultados se procesaron mediante el programa *Graph Pad Inplot* Versión 4.0 de Graph Pad Software Inc. 1992 y con la hoja de cálculo *Excel 97* de Microsoft para *Windows 95*.

6.8 - VALORACIÓN DEL EFECTO DE UN INHIBIDOR DEL GRADIENTE PROTÓNICO TRANSMEMBRANA EN LA SUSCEPTIBILIDAD DE LAS CEPAS A DIFERENTES ANTIMICROBIANOS

Esta valoración se llevó a efecto mediante la incorporación de carbonilcianuro *m*-clorofenilhidrazona (CCCP) a una concentración de 50 μM a las placas de agar de Mueller Hinton. De esta forma, se determinó la susceptibilidad tanto con el método de difusión en agar como con el método de dilución en agar comentados previamente. Asimismo, la susceptibilidad de las diferentes cepas, tanto las cepas origen como los mutantes seleccionados a los diferentes antimicrobianos, se valoró en presencia y en ausencia de 50 μM de CCCP.

6.9 - ESTUDIO DE DETECCIÓN DE MUTACIONES EN LA ADN-GIRASA Y TOPOISOMERASA IV BACTERIANAS

Este estudio fue realizado en la cepas de *Escherichia coli* para descubrir mutaciones en las subunidades GyrA y GyrB de la ADN-girasa, o en las subunidades ParC y ParE de la topoisomerasa IV.

Dicha labor fue realizada por el Dr. Joaquim Ruiz Blázquez bajo la dirección del Profesor Dr. Jordi Vila Estapé (ambos del Departamento de Microbiología del Hospital Clínic i Provincial de Barcelona) y el Servicio Científico y Técnico de la Universidad de Barcelona.

6.10 - ESTUDIO DE LOS CAMBIOS MORFOLÓGICOS MEDIANTE TINCIÓN DE GRAM

Los posibles cambios morfológicos presentes en las cepas mutantes seleccionadas tanto con ceftazidima como con norfloxacina o lomefloxacina fueron valorados mediante microscopía óptica utilizando la tinción de Gram. Se realizó un pase de las cepas a través de agar de MacConkey sin antimicrobiano antes de realizar la tinción.

6.10.1 - TINCIÓN DE GRAM

Fundamento

La tinción de Gram es una tinción diferencial que nos permite clasificar a los microorganismos en dos grandes grupos: grampositivos y gramnegativos. Los grampositivos son aquéllos que resisten la acción decolorante del disolvente (alcohol-acetona 7:3), tras una primera tinción realizada con un colorante básico (Violeta Cristal) y un mordiente (solución de Lugol); mientras que los gramnegativos son decolorados, siendo posteriormente teñidos con un colorante de contraste (Safranina) en una segunda tinción. Debido a este proceso, los microorganismos grampositivos aparecen de color violeta y los gramnegativos de color rojo.
Este hecho es debido a la diferente composición de la pared celular de ambos grupos de microorganismos.
Es conveniente realizar la tinción de Gram sobre células procedentes de un cultivo joven, ya que algunos microorganismos grampositivos sólo presentan dicha coloración durante la fase de crecimiento.

Técnica

- Extensión.
- Desecación al aire o estufa.
- Fijación al calor de la llama mediante ligeros pases.
- Cubrir la extensión con el primer colorante (Violeta Cristal) durante 1,5 minutos.
- Verter y lavar con agua.
- Cubrir con solución de Lugol durante 1 minuto.
- Verter y lavar con agua.
- Decolorar con alcohol-acetona 7:3, hasta que el disolvente salga exento de colorante (unos 30 seg).
- Lavar con agua.
- Teñir con el segundo colorante (Safranina) durante 1 minuto.
- Lavar, secar y observar con objetivo de inmersión en aceite.

VALORACIÓN MEDIANTE MICROSCOPIO:

La valoración de las diferentes tinciones se realizó mediante un microscopio óptico Leitz Orthotlan, provisto de un objetivo de inmersión en aceite de 100× y un ocular 10×, al cual estaba acoplada una cámara Leitz Orthomat. Las fotos fueron tomadas usando película negativa de 100 ASA .

6.11 - CARACTERIZACIÓN DE LAS β-LACTAMASAS PRESENTES EN LAS CEPAS ORIGEN Y EN LAS SELECCIONADAS CON CEFTAZIDIMA

6.11.1 - OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ENZIMÁTICOS CRUDOS

Los cultivos bacterianos, obtenidos después de 18 horas de incubación en medio BHI, se diluyeron en medio fresco en proporción 1/20 incubándose durante 5 horas en agitación a 37 °C. A continuación, se centrifugaron a 4.000 × g durante 20 minutos realizando dos lavados con solución tampón de fosfato sódico 50 mM a pH 7. Los sedimentos obtenidos se resuspendieron en 4 ml de la misma solución tamponante y se sometieron a sonicación hasta que adquirieron cierta transparencia, manteniendo en todo momento su temperatura a no más de 5 °C.

Se centrifugaron a 2.600 × g durante 10 minutos y los sobrenadantes obtenidos se centrifugaron a 45.000 × g durante 1 hora a 4 °C desechando el sedimento y congelando a -20 °C los sobrenadantes obtenidos donde se encuentran las enzimas [212]. A continuación, se determinaron las concentraciones de dichos extractos por el método de Lowry [210].

6.11.2 - VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LOS EXTRACTOS ENZIMÁTICOS CRUDOS

La actividad de las betalactamasas del extracto crudo fue cuantificada mediante ensayo espectrofotométrico en solución reguladora de fosfato 50 mM, pH 7 y 25 °C. Como sustrato se emplearon bencilpenicilina y cefaloridina.

Se prepararon disoluciones de los antimicrobianos a ensayar en solución tampón fosfato sódico 50 mM y pH 7 a las siguientes concentraciones:

Bencilpenicilina	100 µM
Cefaloridina	100 µM

El grado de hidrólisis se determinó en la porción inicial lineal de la curva de hidrólisis utilizando para la bencilpenicilina una longitud de onda de 230 nm y un coeficiente de extinción molar de 800 y para la cefaloridina una longitud de onda de 260 nm y un coeficiente de extinción molar de 10000.

La unidad de actividad β-lactamásica se define como la cantidad de enzima que hidroliza un µmol del antibiótico por minuto a temperatura ambiente y a pH 7.

Las actividades β-lactamásicas fueron estandarizadas por miligramos de proteína. La actividad específica de cada extracto enzimático es la media aritmética de al menos tres determinaciones frente a una misma concentración de cada antibiótico y fue expresada en micromoles de sustrato hidrolizados por minuto y por miligramo de proteínas [15, 299, 319].

Para las medidas espectrofotométricas se utilizó un espectrofotómetro Hitachi U-2000.

6.12 - ESTUDIO ESTADÍSTICO

Para el estudio de las β-lactamasas se utilizó el programa *Enzfitter*, creado por Robin J. Leatherbarrow de Biosoft.

Para los estudios de acumulación de la norfloxacina en el interior celular se utilizaron tanto el *Graph Pad Inplot* Versión 4.0 de Graph Pad Software Inc. 1992, como la hoja de cálculo Microsoft *Excel 97* para *Windows 95*.

Para la redacción del texto se utilizó el procesador de textos *Corel WordPerfect 8*.

En los diversos estudios estadísticos se empleó el coeficiente de correlación de los rangos de Spearman para relacionar variables cuantitativas, con error alfa ≤0,05. Los cálculos y los gráficos de acumulación se realizaron con la hoja de cálculo *Excel 97* para *Windows 95* de Microsoft. Como la hoja de cálculo *Excel* no dispone de la función estadística para obtener el coeficiente de correlación de Spearman pero sí de un lenguaje de programación de macros en *VisualBasic*, se creó un pequeña función para separar un determinado número de valores en sus rangos. Aplicando a estos rangos posteriormente la función del coeficiente de correlación de Pearson, que sí se encuentra implementada en *Excel*, se genera el coeficiente de correlación de Spearman. Dicha rutina se expone a continuación:

```
Option Base 1
Dim RangoCeldas()
Dim MatrizCeldas(): Dim M1(): Dim M2()
Dim NúmCeldas As Integer: Dim A As Integer: Dim u_B As Integer
Dim ContadorA As Integer: Dim ContadorB As Integer
Dim Denominador1 As Single: Dim Denominador2 As Single:
Dim Denominador As Single: Dim Numerador As Single:


'          ************* Función CrearRangos    **************
'==========================================================

Function CrearRangos(CeldaN, RangoCeldas)

' Aplicación.Volátil

NúmCeldas = RangoCeldas.Count
ReDim MatrizCeldas(NúmCeldas, 4)

For ContadorA = 1 To NúmCeldas
  MatrizCeldas(ContadorA, 1) = RangoCeldas(ContadorA)
Next
```

```
For ContadorA = 1 To NúmCeldas
  MatrizCeldas(ContadorA, 2) = 1
  For ContadorB = 1 To NúmCeldas
    If MatrizCeldas(ContadorA, 1) > MatrizCeldas(ContadorB, 1) Then
      MatrizCeldas(ContadorA, 2) = MatrizCeldas(ContadorA, 2) + 1
    End If
  Next ContadorB
Next ContadorA

' ----- El siguiente bucle cuenta repeticiones de las celdas:

For ContadorA = 1 To NúmCeldas
  MatrizCeldas(ContadorA, 3) = 0
  For ContadorB = 1 To NúmCeldas
    If MatrizCeldas(ContadorA, 2) = MatrizCeldas(ContadorB, 2) Then
      MatrizCeldas(ContadorA, 3) = MatrizCeldas(ContadorA, 3) + 1
    End If
  Next ContadorB
Next ContadorA

' ----- El siguiente bucle genera los intervalos de las celdas:
For ContadorA = 1 To NúmCeldas
  MatrizCeldas(ContadorA, 4) = (MatrizCeldas(ContadorA, 3) * (MatrizCeldas(ContadorA, 2)
  + (MatrizCeldas(ContadorA, 3) - 1) / 2)) / MatrizCeldas(ContadorA, 3)
Next ContadorA

' ----- Asocia el valor de la celda a un intervalo:
For ContadorA = 1 To NúmCeldas
  If MatrizCeldas(ContadorA, 1) = CeldaN Then
    CrearRangos = MatrizCeldas(ContadorA, 4): Exit For
  End If
Next ContadorA


End Function

'==============================================================
```

Sección 3
Resultados



7 Resultados: Identificación, Susceptibilidad y Otras Características

1.- **Identificación bacteriana.**
2.- **Estudio de susceptibilidad de *E. coli*.**
3.- **Selección de mutantes de *E. coli* mediante fluoroquinolonas y β-lactámicos.**
   Frecuencias de selección.
4.- **Susceptibilidad de los mutantes de *E. coli*.**
5.- **Estudio estadístico de correlación.**
6.- **Susceptibilidad de otras enterobacterias relacionadas y sus mutantes.**
   Frecuencias de selección mediante quinolonas.
7.- **Estudio morfológico de cepas de *E. coli*.**
8.- **Valoración de la actividad hidrolítica de las β-lactamasas en las cepas de *E. coli*.**

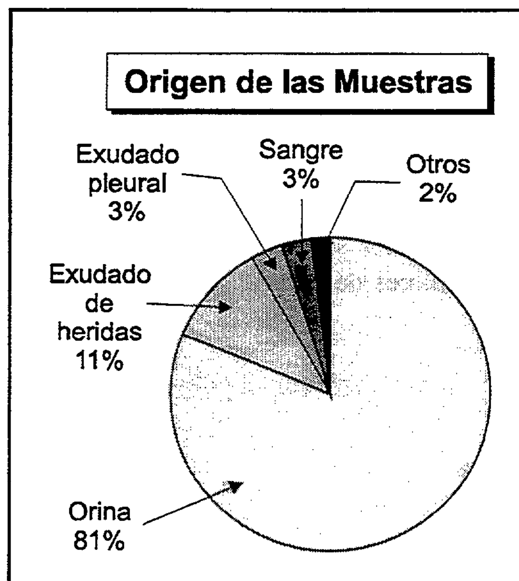
7.1 - Identificación Bacteriana

El trabajo se comenzó con 110 cepas de la especie *Escherichia coli* aisladas en el Servicio de Microbiología del Hospital Insular de Las Palmas de Gran Canaria, durante los años 1991y 1992, e identificadas mediante el sistema automatizado PASCO.

El origen de las muestras fue el siguiente:

Orina	81%
Exudado de heridas	11%
Exudado pleural	3%
Sangre	3%
Otros	2%

La identificación bacteriana fue confirmada mediante la batería de pruebas bioquímicas API 20E (DIFCO) así como por el aspecto morfológico de las colonias aisladas en medio de agar de MacConkey y del caracter oxidasa positivo de todas las cepas.



7.2 - ESTUDIO DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS EN LAS CEPAS ORIGEN DE *ESCHERICHIA COLI*

Las susceptibilidades de las 110 cepas primitivas fueron estudiadas frente a los siguientes antimicrobianos:

Grupo	Antimicrobiano
Quinolonas	Ácido nalidíxico Ácido pipemídico Ciprofloxacina Lomefloxacina Norfloxacina Ofloxacina Temafloxacina
β-lactámicos	Cefalotina Cefazolina Cefixima Cefotaxima Cefoxitina Cefpiroma Ceftazidima Ceftizoxima Ceftriaxona Imipenem

Los resultados se muestran en la tabla 47 como valores de CMI50, CMI90 y rangos.

Como se puede observar el conjunto de cepas es sensible en general a todas las quinolonas, excepto al ácido nalidíxico, para el que se observaron varias resistencias. También se observaron resistencias al ácido pipemídico pero menos. La ciprofloxacina se presentó como la quinolona más activa. Estas cepas también se mostraron sensibles a las cefalosporinas de segunda, tercera y cuarta generación, presentando resistencia a la cefalotina la mayoría de ellas.

De estas 110 cepas primitivas seleccionamos el 10%, es decir un conjunto de 11 cepas, basándonos en su perfil de resistencia ya comentado. Sus pruebas bioquímicas de identificación API 20E (DIFCO) se resumen en la tabla 46.

Estas 11 cepas origen fueron sometidas, a continuación, a otras pruebas más detalladas de susceptibilidad frente a otros antimicrobianos. Los resultados se resumen en la tabla 48 como valores de CMI50, CMI90 y rangos. En dicha tabla podemos observar que el conjunto de cepas es sensible en general a todas las quinolonas, pero que el nivel de resistencia ha aumentado respecto al conjunto inicial, y que casi todas las cepas son resistentes al ácido nalidíxico.

TABLA 46.- PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE IDENTIFICACIÓN API 20E DE LAS CEPAS ORIGEN DE *E. COLI* UTILIZADAS EN ESTE ESTUDIO

Prueba		Cepas										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
β-Galactosidasa	ONPG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginina–dihidrolasa	ADH	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–
Lisina–descarboxilasa	LDC	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+
Ornitina–descarboxilasa	ODC	+	+	–	+	–	+	+	–	–	+	+
Citrato de Simmons	CIT	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Formación de SH_2	SH_2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Ureasa	URE	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Triptófano–desaminasa	TDA	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Indol	IND	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Voges Proskauer	VP	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Hidrólisis de la Gelatina	GEL	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Fermentación de azúcares:												
Glucosa	GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	MAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	INO	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Sorbitol	SOR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rhamnosa	RHA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarosa	SAC	+	–	–	–	–	–	–	+	+	+	–
Melibiosa	MEL	+	+	+	+	–	+	–	+	+	+	–
Amigdalina	AMY	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Arabinosa	ARA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	OX	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Red. Nitratos a Nitritos	NO_2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Movilidad	MOB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento en MacConkey	McC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

TABLA 47.- SUSCEPTIBILIDADES DEL CONJUNTO DE LOS 110 AISLAMIENTOS CLÍNICOS INICIALES DE *E. COLI*, FRENTE A DIVERSOS ANTIMICROBIANOS

Antimicrobianos		Concentraciones (mg/l)		
		CMI_{50}	CMI_{90}	Rango
Ácido nalidíxico	NAL	2	4	0,06 – >512
Ácido pipemídico	AP	2	4	0,06 – 32
Norfloxacina	NOR	0,06	0,12	0,06 – 1
Lomefloxacina	LMF	0,06	0,12	0,06 – 1
Ciprofloxacina	CIP	0,06	0,06	0,06 – 0,25
Temafloxacina	TMF	0,06	0,06	0,06 – 0,5
Ofloxacina	OFX	0,06	0,06	0,06 – 0,5
Cefalotina	CLT	16	32	4 – >32
Cefazolina	CZ	0,5	2	0,06 – 8
Cefixima	CFX	0,12	0,5	0,06 – >8
Cefotaxima	CTX	0,06	0,06	0,06 – 0,25
Cefoxitina	FOX	2	4	0,06 – 8
Cefpiroma	HR	0,06	0,06	0,06 – 0,25
Ceftazidima	CAZ	0,06	0,12	0,06 – 8
Ceftizoxima	ZOX	0,06	0,06	0,06 – 16
Ceftriaxona	CRO	0,06	0,25	0,06 – 0,5
Imipenem	IMP	0,06	0,12	0,06 – 0,25

TABLA 48.- SUSCEPTIBILIDADES DEL CONJUNTO ELEGIDO DE LAS 11 CEPAS ORIGEN DE *E. COLI*, FRENTE A DIVERSOS ANTIMICROBIANOS

Antimicrobianos		Concentraciones (mg/l)		
		CMI_{50}	CMI_{90}	Rango
Ácido nalidíxico	NAL	4	256	2 – 1024
Ciprofloxacina	CIP	0,06	0,25	0,06 – 0,5
Norfloxacina	NOR	0,25	0,5	0,06 – 1
Lomefloxacina	LMF	0,12	0,5	0,12 – 2
Ofloxacina	OFX	0,12	1	0,06 – 1
Temafloxacina	TMF	0,06	0,25	0,06 – 0,25
Esparfloxacina	SPX	0,12	0,5	0,06 – 0,5
Cefalotina	CLT	16	32	2 – 64
Cefoxitina	FOX	4	4	1 – 8
Ceftazidima	CAZ	0,25	0,5	0,06 – 0,5
Cefotaxima	CTX	0,06	0,25	0,03 – 0,25
Ceftizoxima	ZOX	0,06	0,06	0,06 – 0,12
Ceftriaxona	CRO	0,06	0,06	0,06 – 0,25
Imipenem	IMP	0,25	0,25	0,12 – 0,25
Meropenem	MRP	0,0035	0,015	0,0035 – 0,015
Tetraciclina	TC	2	128	0,06 – 128
Gentamicina	GM	1	2	1 – 64
Tobramicina	TM	1	2	1 – 8
Amikacina	AMK	4	4	2 – 8
Acriflavina	ACR	64	128	32 – 128
Bromuro de etidio	BE	256	512	256 – 512
Novobiocina	NOV	64	128	32 – 1024
Mitomicina C	MTC	8	8	4 – 16

7.3 - SELECCIÓN DE MUTANTES DE *ESCHERICHIA COLI* CON FLUOROQUINOLONAS Y β-LACTÁMICOS. FRECUENCIAS DE SELECCIÓN

Se investigó la capacidad selectiva de las fluoroquinolonas sobre las 11 cepas origen de *Escherichia coli* sometiéndolas a concentraciones crecientes de antimicrobiano.

Las cepas concretas con las que se ha realizado este trabajo de tesis han sido numeradas con un número del 1 al 18 seguidas de una letra: P para las cepas origen, N para las cepas mutantes seleccionadas con norfloxacina, L para las cepas mutantes seleccionadas con lomefloxacina y C para las cepas mutantes seleccionadas con ceftazidima. De igual manera las cepas del 1 al 11 pertenecen a la especie *Escherichia coli* y son a las que nos referimos en el párrafo anterior y las numeradas del 12 al 18 son otras enterobacterias a las que nos referiremos más adelante y que se citan con detalle en la tabla 61.

A partir de las referidas 11 cepas, se seleccionaron con norfloxacina 11 mutantes resistentes a fluorquinolonas tras tres escalones selectivos, excepto para las cepas 1P y 5P que originaron mutantes tras dos escalones y la cepa 11P que solo aceptó un escalón selectivo. Posteriormente desaparecieron, porque no eran viables, las cepas mutantes 7N y 11N. Las frecuencias de selección para la norfloxacina, y el nivel de resistencia alcanzado, se indican en la tabla 49.

Con la lomefloxacina también se seleccionaron 11 mutantes resistentes a quinolonas. Las cepas 2P, 3P, 4P, 6P, 9P y 10P originaron mutantes tras tres escalones selectivos, en tanto que las cepas 1P, 5P, 7P y 8P lo hicieron tras dos escalones y la cepa 11P solo aceptó un escalón selectivo. De igual modo que en el caso anterior, al poco tiempo desaparecieron por inviables las cepas de *E. coli* mutantes 8L y 11L. Las frecuencias de selección para la lomefloxacina, y el nivel de resistencia alcanzado, se indican en la tabla 50.

También se intentó seleccionar mutantes con la ciprofloxacina y esparfloxacina a partir de las indicadas 11 cepas de *E. coli*, pero no se seleccionó ningún mutante con ninguna de las dos fluoroquinolonas.

La selección con β-lactámicos, a partir de las 11 cepas de *E. coli* ya indicadas, se realizó con imipenem, cefotaxima y ceftazidima. Con los dos primeros no se obtuvo ningún mutante viable, en tanto que con ceftazidima se obtuvieron 11 mutantes resistentes a ceftazidima tras dos escalones selectivos, excepto para las cepas 1P, 7P, 9P y 11P que dieron lugar a mutantes tras tres escalones selectivos. De este conjunto de cepas mutantes solo se mantuvieron viables las cepas 1C, 7C y 11C. Las frecuencias de selección para la ceftazidima, y el nivel de resistencia alcanzado, se indican en la tabla 51.

Sólo fueron estudiados los mutantes más resistentes (18 cepas), es decir, aquéllos que crecieron a una concentración de antimicrobiano ≥8 mg/l.

En la tabla 52 se hace un resumen por rangos de las frecuencias de selección obtenidos en las cepas de *E. coli* seleccionadas con norfloxacina (NOR), lomefloxacina (LMF) y ceftazidima (CAZ).

TABLA 49.- FRECUENCIAS[a] DE SELECCIÓN CON NOR DE LAS CEPAS DE *E. COLI*

Cepa	CMI Origen	Paso 1			Paso 2			Paso 3		
		v1	CMI 1	Δ1 CMI	v2	CMI 2	Δ2 CMI	v3	CMI 3	Δ3 CMI
1	0,5	---	---	---	$4 \cdot 10^{-6}$	2	4	$1 \cdot 10^{-8}$	16	32
2	0,06	$4 \cdot 10^{-9}$	0,25	4	$1 \cdot 10^{-8}$	2	32	$6 \cdot 10^{-7}$	16	256
3	0,06	$4 \cdot 10^{-9}$	0,25	4	$5 \cdot 10^{-9}$	2	32	$6 \cdot 10^{-8}$	8	128
4	0,06	$2 \cdot 10^{-7}$	0,25	4	$2 \cdot 10^{-8}$	1	16	$1 \cdot 10^{-8}$	8	128
5	0,5	---	---	---	$1 \cdot 10^{-8}$	4	8	$5 \cdot 10^{-8}$	16	32
6	0,06	$2 \cdot 10^{-8}$	0,25	4	$5 \cdot 10^{-9}$	2	32	$3 \cdot 10^{-8}$	8	128
7	0,25	$5 \cdot 10^{-6}$	0,5	2	$5 \cdot 10^{-9}$	2	8	$7 \cdot 10^{-10}$	4	16
8	0,06	$1 \cdot 10^{-8}$	0,25	4	$5 \cdot 10^{-6}$	2	32	$6 \cdot 10^{-9}$	4	64
9	0,06	$1 \cdot 10^{-8}$	0,12	2	$2 \cdot 10^{-9}$	1	16	$2 \cdot 10^{-7}$	8	128
10	0,12	$4 \cdot 10^{-8}$	0,5	4	$6 \cdot 10^{-6}$	2	16	$2 \cdot 10^{-8}$	8	64
11	0,06	$3 \cdot 10^{-8}$	0,12	2	---	---	---	---	---	---

[a] Paso 1 => CMI: 0,12 - 1 Paso 2 => CMI: 1 - 4 Paso 3 => CMI: 4 - 32

CMI = Concentración Mínima Inhibitoria	ν = Frecuencia	Δ = Incremento acumulado

TABLA 50.- FRECUENCIAS DE SELECCIÓN CON LMF DE LAS CEPAS DE *E. COLI*

Cepa	CMI Origen	Paso 1			Paso 2			Paso 3		
		v1	CMI 1	Δ1 CMI	v2	CMI 2	Δ2 CMI	v3	CMI 3	Δ3 CMI
1	1	---	---	---	$3 \cdot 10^{-8}$	4	4	$5 \cdot 10^{-6}$	8	8
2	0,06	$4 \cdot 10^{-6}$	0,12	2	$1 \cdot 10^{-8}$	4	64	$3 \cdot 10^{-6}$	8	128
3	0,06	$2 \cdot 10^{-6}$	0,12	2	$1 \cdot 10^{-7}$	4	64	$1 \cdot 10^{-7}$	8	128
4	0,06	$5 \cdot 10^{-7}$	0,12	2	$2 \cdot 10^{-8}$	2	32	$7 \cdot 10^{-8}$	8	128
5	1	---	---	—	$8 \cdot 10^{-7}$	4	4	$4 \cdot 10^{-8}$	16	16
6	0,06	$3 \cdot 10^{-7}$	0,12	2	$1 \cdot 10^{-8}$	2	32	$8 \cdot 10^{-7}$	4	64
7	1	---	---	---	$1 \cdot 10^{-7}$	2	2	$2 \cdot 10^{-8}$	4	4
8	0,06	$3 \cdot 10^{-6}$	0,12	2	$5 \cdot 10^{-6}$	4	64	---	---	---
9	0,06	$2 \cdot 10^{-7}$	0,12	2	$4 \cdot 10^{-8}$	2	32	$4 \cdot 10^{-6}$	4	64
10	0,25	$6 \cdot 10^{-6}$	0,5	2	$7 \cdot 10^{-6}$	2	8	$5 \cdot 10^{-8}$	4	16
11	0,06	$3 \cdot 10^{-7}$	0,12	2	---	---	---	---	---	---

Paso 1 => CMI: 0,12 - 1 Paso 2 => CMI: 1 - 4 Paso 3 => CMI: 4 - 32

TABLA 51.- FRECUENCIAS DE SELECCIÓN CON CAZ EN LAS CEPAS DE *E. COLI*										
Cepa	CMI Origen	Paso 1			Paso 2			Paso 3		
		ν1	CMI 1	Δ1 CMI	ν2	CMI 2	Δ2 CMI	ν3	CMI 3	Δ3 CMI
1	0,12	$2 \cdot 10^{-7}$	0,5	4	$1 \cdot 10^{-5}$	4	32	$5 \cdot 10^{-8}$	32	256
2	0,12	$2 \cdot 10^{-8}$	0,5	4	$2 \cdot 10^{-8}$	4	32	---	---	---
3	0,06	$4 \cdot 10^{-9}$	0,5	8	$1 \cdot 10^{-7}$	4	64	---	---	---
4	0,12	$3 \cdot 10^{-7}$	0,25	2	$8 \cdot 10^{-8}$	2	16	---	---	---
5	0,12	$5 \cdot 10^{-8}$	0,5	4	$1 \cdot 10^{-5}$	4	32	---	---	---
6	0,12	$5 \cdot 10^{-8}$	0,5	4	$6 \cdot 10^{-7}$	1	8	---	---	---
7	0,06	$1 \cdot 10^{-7}$	0,5	8	$4 \cdot 10^{-5}$	2	32	$4 \cdot 10^{-7}$	16	256
8	0,06	$2 \cdot 10^{-5}$	0,5	8	$4 \cdot 10^{-5}$	1	16	---	---	---
9	0,06	$8 \cdot 10^{-9}$	0,25	4	$1 \cdot 10^{-6}$	2	32	$5 \cdot 10^{-8}$	16	256
10	0,06	$1 \cdot 10^{-6}$	0,25	4	$3 \cdot 10^{-7}$	2	32	---	---	---
11	0,25	$7 \cdot 10^{-9}$	0,5	2	$2 \cdot 10^{-7}$	4	16	$7 \cdot 10^{-5}$	32	128

CMI = Concentración Mínima Inhibitoria	ν = Frecuencia	Δ = Incremento acumulado

TABLA 52.- RANGOS DE FRECUENCIAS DE SELECCIÓN OBTENIDOS EN LAS CEPAS DE *E. COLI* SELECCIONADAS CON NOR, LMF Y CAZ			
Frecuencia de selección	**PASO 1 Rango => 0,12 - 1**	**PASO 2 Rango => 1 - 4**	**PASO 3 Rango => 4 - 32**
ν_{NOR}	$5 \cdot 10^{-6}$ — $4 \cdot 10^{-9}$	$6 \cdot 10^{-6}$ — $2 \cdot 10^{-9}$	$6 \cdot 10^{-7}$ — $7 \cdot 10^{-10}$
ν_{LMF}	$6 \cdot 10^{-6}$ — $1 \cdot 10^{-7}$	$7 \cdot 10^{-6}$ — $1 \cdot 10^{-8}$	$5 \cdot 10^{-6}$ — $2 \cdot 10^{-8}$
ν_{CAZ}	$2 \cdot 10^{-5}$ — $4 \cdot 10^{-9}$	$4 \cdot 10^{-5}$ — $2 \cdot 10^{-8}$	$7 \cdot 10^{-5}$ — $5 \cdot 10^{-8}$

7.4 - SUSCEPTIBILIDAD DE LOS MUTANTES DE *ESCHERICHIA COLI*

El conjunto de las susceptibilidades de los 18 mutantes de *E. coli* seleccionados a fluoroquinolonas, es decir de los 9 seleccionados con lomefloxacina (LMF, mutantes L) y de los otros 9 seleccionados con norfloxacina (NOR, mutantes N), se expone en la tabla 53. Al compararla con la tabla 48 podemos apreciar una disminución de la susceptibilidad para todos los antimicrobianos en general y una notable dismunución de dicha sensibilidad para las quinolonas, en particular, así como para algunas cefalosporinas y otros compuestos como novobiocina y mitomicina C. En las tablas 54A, 54B y 54C se exponen con detalle las susceptibilidades para cada una de las cepas origen P y sus mutantes seleccionados, tanto N como L y C.

TABLA 53.- SUSCEPTIBILIDADES FRENTE A DIVERSOS ANTIMICROBIANOS DEL CONJUNTO DE LAS 18 CEPAS MUTANTES DE *E. COLI* SELECCIONADAS CON NOR Y LMF

Antimicrobianos		Concentraciones (mg/l)		
		CMI_{50}	CMI_{90}	Rango
Ácido nalidíxico	NAL	2048	4096	256 – 4096
Ciprofloxacina	CIP	8	16	1 – 16
Norfloxacina	NOR	32	32	2 – 32
Lomefloxacina	LMF	32	64	8 – 64
Ofloxacina	OFX	8	16	2 – 16
Temafloxacina	TMF	16	32	0,5 – 32
Esparfloxacina	SPX	4	8	0,5 – 8
Cefalotina	CLT	64	256	16 – 512
Cefoxitina	FOX	32	64	4 – 128
Ceftazidima	CAZ	1	2	0,5 – 2
Cefotaxima	CTX	0,5	1	0,25 – 1
Ceftizoxima	ZOX	0,25	0,5	0,06 – 1
Ceftriaxona	CRO	0,06	0,12	0,06 – 0,12
Imipenem	IMP	0,25	0,25	0,06 – 0,5
Meropenem	MRP	0,03	0,12	0,007 – 0,25
Tetraciclina	TC	8	256	1 – 512
Gentamicina	GM	0,5	8	0,12 – 64
Tobramicina	TM	0,5	2	0,06 – 8
Amikacina	AMK	2	4	0,5 – 8
Acriflavina	ACR	256	512	32 – 512
Bromuro de etidio	BE	1024	2048	128 – 2048
Novobiocina	NOV	1024	2048	128 – 2048
Mitomicina C	MTC	64	128	16 – 128

7.4 - SUSCEPTIBILIDAD DE LOS MUTANTES DE *ESCHERICHIA COLI*

El conjunto de las susceptibilidades de los 18 mutantes de *E. coli* seleccionados a fluoroquinolonas, es decir de los 9 seleccionados con lomefloxacina (LMF, mutantes L) y de los otros 9 seleccionados con norfloxacina (NOR, mutantes N), se expone en la tabla 53. Al compararla con la tabla 48 podemos apreciar una disminución de la susceptibilidad para todos los antimicrobianos en general y una notable dismunución de dicha sensibilidad para las quinolonas, en particular, así como para algunas cefalosporinas y otros compuestos como novobiocina y mitomicina C. En las tablas 54A, 54B y 54C se exponen con detalle las susceptibilidades para cada una de las cepas origen P y sus mutantes seleccionados, tanto N como L y C.

TABLA 53.- SUSCEPTIBILIDADES FRENTE A DIVERSOS ANTIMICROBIANOS DEL CONJUNTO DE LAS 18 CEPAS MUTANTES DE *E. COLI* SELECCIONADAS CON NOR Y LMF

Antimicrobianos		Concentraciones (mg/l)		
		CMI_{50}	CMI_{90}	Rango
Ácido nalidíxico	NAL	2048	4096	256 – 4096
Ciprofloxacina	CIP	8	16	1 – 16
Norfloxacina	NOR	32	32	2 – 32
Lomefloxacina	LMF	32	64	8 – 64
Ofloxacina	OFX	8	16	2 – 16
Temafloxacina	TMF	16	32	0,5 – 32
Esparfloxacina	SPX	4	8	0,5 – 8
Cefalotina	CLT	64	256	16 – 512
Cefoxitina	FOX	32	64	4 – 128
Ceftazidima	CAZ	1	2	0,5 – 2
Cefotaxima	CTX	0,5	1	0,25 – 1
Ceftizoxima	ZOX	0,25	0,5	0,06 – 1
Ceftriaxona	CRO	0,06	0,12	0,06 – 0,12
Imipenem	IMP	0,25	0,25	0,06 – 0,5
Meropenem	MRP	0,03	0,12	0,007 – 0,25
Tetraciclina	TC	8	256	1 – 512
Gentamicina	GM	0,5	8	0,12 – 64
Tobramicina	TM	0,5	2	0,06 – 8
Amikacina	AMK	2	4	0,5 – 8
Acriflavina	ACR	256	512	32 – 512
Bromuro de etidio	BE	1024	2048	128 – 2048
Novobiocina	NOV	1024	2048	128 – 2048
Mitomicina C	MTC	64	128	16 – 128

TABLA 54A.- SUSCEPTIBILIDADES DE LAS CEPAS ORIGEN DE *E. COLI* Y SUS MUTANTES SELECCIONADAS (PARTE A)

Cepa	Antimicrobianos (CMI en mg/l)						
	NAL	NOR	LMF	TMF	CIP	OFX	SPX
ATCC25922	4	0,06	0,12	0,06	0,06	0,12	0,06
KL16	4	0,12	0,06	0,12	0,015	0,06	0,06
JF703	8	0,5	0,12	0,06	0,03	0,25	0,12
1P	128	1	2	0,25	0,25	1	0,5
1N	1024	8	16	1	4	2	2
1L	4096	16	32	32	2	4	8
1C	128	0,25	2	0,5	1	2	1
2P	4	0,5	0,12	0,06	0,06	0,12	0,06
2N	2048	32	32	16	16	8	8
2L	4096	32	32	16	16	8	8
3P	4	0,25	0,12	0,06	0,06	0,12	0,06
3N	4096	16	16	16	4	8	4
3L	4096	32	32	16	8	16	4
4P	4	0,06	0,12	0,06	0,06	0,12	0,06
4N	4096	32	32	16	8	8	4
4L	4096	32	64	32	16	16	8
5P	1024	0,5	2	0,25	0,5	1	0,5
5N	2048	32	32	32	8	16	8
5L	4096	32	64	32	16	16	8
6P	4	0,06	0,12	0,06	0,06	0,06	0,06
6N	2048	32	16	4	4	4	2
6L	4096	16	16	4	8	8	4
7P	256	1	0,5	0,12	0,25	1	0,25
7L	2048	2	8	0,5	1	2	4
7C	1024	4	4	2	2	4	2
8P	2	0,06	0,12	0,06	0,06	0,12	0,06
8N	2048	16	16	2	2	4	2
9P	2	0,12	0,12	0,12	0,06	0,06	0,25
9N	2048	32	32	16	8	8	8
9L	1024	32	32	32	8	8	8
10P	32	0,25	0,5	0,06	0,12	0,5	0,12
10N	256	16	16	1	2	4	1
10L	2048	8	8	0,5	1	2	0,5
11P	2	0,06	0,12	0,25	0,25	1	0,5
11C	128	1	2	0,5	1	2	1

NAL, Ácido nalidíxico; NOR, Norfloxacina; LMF, Lomefloxacina; TMF, Temafloxacina; CIP, Ciprofloxacina; OFX, Ofloxacina; SPX, Esparfloxacina

TABLA 54B.- SUSCEPTIBILIDADES DE LAS CEPAS ORIGEN DE *E. COLI* Y SUS MUTANTES SELECCIONADAS (PARTE B)

Cepa	Antimicrobianos (CMI en mg/l)							
	CLT	FOX	ZOX	CAZ	CTX	CRO	IPM	MRP
ATCC25922	8	4	0,25	0,25	0,06	0,25	0,25	0,015
KL16	4	2	0,06	0,12	0,06	0,06	0,5	0,03
JF703	8	8	0,12	0,5	0,06	0,06	0,5	0,03
1P	32	2	0,06	0,5	0,06	0,06	0,25	0,0035
1N	256	32	0,25	1	0,25	0,12	0,25	0,03
1L	64	16	0,12	1	0,5	0,06	0,25	0,03
1C	32	8	0,25	32	0,5	0,25	0,25	0,015
2P	16	8	0,06	0,5	0,25	0,06	0,25	0,015
2N	128	32	0,25	1	1	0,06	0,25	0,03
2L	64	32	0,25	1	1	0,12	0,06	0,015
3P	64	4	0,06	0,06	0,06	0,06	0,25	0,015
3N	128	64	0,25	1	0,25	0,06	0,25	0,12
3L	64	32	0,25	0,5	0,5	0,06	0,12	0,06
4P	16	4	0,06	0,12	0,06	0,06	0,25	0,007
4N	32	32	0,25	0,5	0,25	0,06	0,06	0,03
4L	32	32	0,5	0,5	0,25	0,12	0,12	0,015
5P	32	2	0,12	0,5	0,12	0,06	0,25	0,0035
5N	32	16	0,25	1	0,5	0,06	0,25	0,06
5L	32	4	0,5	1	0,25	0,12	0,12	0,015
6P	16	4	0,06	0,25	0,25	0,06	0,25	0,0035
6N	32	32	0,25	2	0,5	0,06	0,25	0,03
6L	16	32	0,5	2	0,5	0,12	0,25	0,06
7P	8	1	0,06	0,06	0,03	0,06	0,25	0,015
7L	32	8	0,06	1	0,5	0,06	0,5	0,03
7C	32	16	0,25	32	1	0,5	0,5	0,03
8P	32	4	0,06	0,25	0,12	0,06	0,25	0,007
8N	64	32	0,25	1	1	0,06	0,12	0,015
9P	16	4	0,06	0,25	0,03	0,06	0,12	0,0035
9N	64	16	0,5	1	1	0,12	0,12	0,03
9L	64	64	0,5	1	1	0,06	0,06	0,007
10P	16	4	0,06	0,25	0,03	0,25	0,25	0,0035
10N	512	128	1	1	1	0,12	0,12	0,25
10L	32	64	0,12	2	1	0,06	0,25	0,03
11P	2	2	0,06	0,25	0,03	0,06	0,25	0,0035
11C	32	32	0,5	32	0,5	2	0,5	0,015

CLT, Cefalotina; FOX, Cefoxitina; ZOX, Ceftizoxima; CAZ, Ceftazidima
CTX, Cefotaxima; CRO, Ceftriaxona; IMP, Imipenem; MRP, Meropenem

TABLA 54C.- SUSCEPTIBILIDADES DE LAS CEPAS ORIGEN DE *E. COLI* Y SUS MUTANTES SELECCIONADAS (PARTE C)

Cepa	Antimicrobianos (CMI en mg/l)[1]								
	GM	TM	AMK	TC	ACR	BE	NOV	MTC	CCCP[1]
ATCC25922	16	8	4	2	ND	ND	8	ND	ND
KL16	ND	ND	ND	2	ND	ND	ND	ND	ND
JF703	ND	ND	ND	4	ND	ND	ND	ND	ND
1P	64	8	4	1	64	256	32	8	100
1N	64	8	1	1	32	128	128	16	100
1L	32	4	1	16	256	2048	512	64	100
1C	128	16	8	1	128	256	32	8	400
2P	1	1	4	128	64	512	128	8	100
2N	0,5	1	2	512	256	2048	2048	64	100
2L	0,5	1	4	512	512	2048	>2048	>128	100
3P	1	1	2	4	32	256	64	8	200
3N	0,5	0,5	4	16	256	2048	1024	64	400
3L	0,12	0,06	0,5	8	32	2048	1024	128	100
4P	1	1	4	2	128	256	32	8	200
4N	0,25	0,12	1	4	256	512	1024	32	>400
4L	0,25	0,12	2	8	512	1024	2048	64	100
5P	2	2	8	2	128	512	1024	4	100
5N	2	1	4	8	256	2048	1024	32	200
5L	2	2	8	4	128	1024	512	32	100
6P	1	2	2	4	128	256	128	8	200
6N	1	1	1	4	256	2048	2048	64	200
6L	1	1	4	16	512	2048	2048	64	400
7P	1	1	2	2	64	256	64	8	100
7L	0,25	0,12	1	32	256	1024	512	64	200
7C	64	16	1	64	512	128	512	64	400
8P	2	1	2	32	64	512	64	16	100
8N	1	0,5	4	4	32	512	128	16	>400
9P	1	1	4	1	64	256	32	8	100
9N	1	0,5	4	8	256	512	1024	32	100
9L	0,5	0,5	4	16	128	2048	2048	128	>400
10P	1	1	4	128	128	256	32	8	100
10N	0,5	1	4	128	512	512	1024	64	100
10L	0,5	0,5	1	128	512	1024	512	32	100
11P	1	1	4	0,06	64	256	32	8	100
11C	1	1	4	1	128	256	32	8	400

GM, Gentamicina; TM, Tobramicina; AMK, Amikacina; TC, Tetraciclina
ACR, Acriflavina; BE, Bromuro de Etidio; NOV, Novobiocina; MTC, Mitomicina-C
CCCP, Carbonil cianuro *m*-clorofenilhidrazona; ND, No Determinado
[1] CMI de CCCP expresada en µM

7.5 - ESTUDIO ESTADÍSTICO DE CORRELACIÓN

TEST DE CORRELACIÓN DE SPEARMAN

Se realizó posteriormente el **estudio de correlación** entre la susceptibilidad a diferentes antimicrobianos tanto en las cepas origen de *E. coli* como en sus mutantes seleccionadas.

El índice de correlación nos da idea del grado de relación entre dos variables estadísticas aleatorias cuantitativas. El índice de correlación de Spearman relaciona entre sí variables agrupadas por rangos. Dicho índice puede tomar cualquier valor entre -1 y +1. Si es +1 ó -1 se dice que las dos variables están relacionadas total y perfectamente entre ellas mediante una correlación positiva o negativa. Conforme se va aproximando dicho valor a cero, tanto por arriba como por abajo, se irá perdiendo dicha correlación entre las variables de forma que, al llegar a ser cero dicho índice de correlación, se puede decir que no existe relación alguna entre las dos variables.

En nuestro caso las CMIs de NOR o LMF presentadas por el conjunto de cepas origen y mutantes seleccionadas de *E. coli*, las hemos relacionado con las CMI presentadas por el mismo conjunto frente a otros antimicrobianos, presentando los datos en la tabla 55. De los datos podemos deducir que, en el conjunto total de las cepas, existe una alta correlación entre la susceptibilidad a norfloxacina o lomefloxacina con el resto de fluorquinolonas, así como con ceftizoxima, novobiocina y mitomicina C; una correlación media con el resto de cefalosporinas ensayadas, así como con meropenem y bromuro de etidio; una baja correlación con imipenem, gentamicina, tobramicina, tetraciclina y acriflavina; y nula correlación con ceftriaxona, amikacina y CCCP.

Asimismo hemos relacionado las CMIs presentadas por las cepas mutantes seleccionadas con NOR, con las CMIs presentadas por las mismas cepas frente a otros antimicrobianos, presentando los datos en la tabla 56. De estos datos se deduce que en los mutantes N de *E. coli* existe una alta correlación entre la susceptibilidad presentada a norfloxacina con la presentada a lomefloxacina, sin embargo sólo existe una correlación media entre la presentada a norfloxacina con la presentada al resto de fluoroquinolonas, así cómo a la cefalotina, cefoxitina, novobiocina y bromuro de etidio; una correlación baja con el ácido nalidíxico, ceftriaxona, tobramicina, acriflavina y mitomicina C; y escasa o nula correlación con ceftizoxima, ceftazidima, imipenem, meropenem, amikacina, tetraciclina y CCCP.

De igual forma, hemos relacionado las CMIs presentadas por las cepas mutantes seleccionadas con LMF, con las CMIs presentadas por las mismas cepas frente a otros antimicrobianos, presentando los datos en la misma tabla. De estos datos se deduce que en los mutantes L de *E. coli* existe una alta correlación entre la susceptibilidad presentada a lomefloxacina con la presentada al resto de las quinolonas, excepto para el ácido nalidíxico con el cual presenta un correlación media así como con tetraciclina, CCCP y el resto de los β-lactámicos, excepto con cefoxitina y cefalotina con los que presenta una correlación baja. También presenta una baja correlación con amikacina, acriflavina y novobiocina, y una escasa o nula correlación con gentamicina, tobramicina, bromuro de etidio y mitomicina C.

En el subconjunto de las cepas origen se ha relacionado, mediante el test de correlación de Spearman, las CMIs de un determinado antimicrobiano A con las CMIs de otro antimicrobiano B, con el fin de observar la existencia de algún tipo de relación entre ellos. Estas relaciones apareadas se han realizado con una serie de antimicrobianos. Los datos se exponen en las tablas 57A y 57B. En dichas tablas el índice de correlación de Spearman entre dos antimicrobianos se encuentra en la intersección de la fila correspondiente a un antimicrobiano con la columna correspondiente al otro antimicrobiano. Es indistinto si el antimicrobiano A se encuentra en la fila y el B en la columna o viceversa.

Debido a la dificultad de apreciar a simple vista los datos de dichas tablas, se ha confeccionado un mapa gráfico con dichos datos agrupados por rangos (alta correlación=rojo, media=verde, baja=azul, escasa=amarillo y nula correlación=blanco). Los valores de la correlación entre dos antimicrobianos coinciden con la intersección de las líneas de la rejilla. El mapa se expone en la página 203. Las abreviaturas coinciden con las de la tabla 55. El signo + después de algunas de ellas indica que la CMI de ese antimicrobiano se ha valorado en un medio con 50 μM de carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona.

En las tablas 58A y 58B se presentan los datos obtenidos mediante un trabajo similar al anteriormente expuesto pero tomando como base el subconjunto de cepas mutantes N de *Escherichia coli*. De igual forma el mapa está situado en la página 207.

De la misma forma, en las tablas 59A y 59B se presentan los datos obtenidos mediante otro trabajo similar al anteriormente expuesto pero tomando como base el subconjunto de cepas mutantes L de *Escherichia coli*. El mapa correspondiente puede verse en la página 211.

TABLA 55 - COEFICIENTES DE SPEARMAN (CS) DE L CONJUNTO DE LAS CEPAS ORIGEN DE *E. COLI* Y SUS MUTANTES SELECCIONADOS CON NOR Y LMF (32 CEPAS)

	Antimicrobianos							
	NAL	NOR	LMF	TMF	CIP	OFX	SPX	CCCP
CS (NOR)	0,86	1,00	0,95	0,88	0,90	0,89	0,85	0,10
CS (LMF)	0,89	0,95	1,00	0,93	0,93	0,92	0,91	0,07
	Antimicrobianos							
	CLT	**FOX**	**ZOX**	**CAZ**	**CTX**	**CRO**	**IPM**	**MRP**
CS (NOR)	0,54	0,66	0,74	0,48	0,63	0,11	-0,40	0,65
CS (LMF)	0,57	0,61	0,76	0,48	0,60	0,19	-0,44	0,57
	Antimicrobianos							
	GM	**TM**	**AMK**	**TC**	**ACR**	**BE**	**NOV**	**MTC**
CS (NOR)	-0,39	-0,40	-0,17	0,36	0,48	0,72	0,79	0,77
CS (LMF)	-0,31	-0,31	-0,13	0,33	0,50	0,68	0,74	0,76

NAL, Ácido nalidíxico; NOR, Norfloxacina; LMF, Lomefloxacina
TMF, Temafloxacina; CIP, Ciprofloxacina; OFX, Ofloxacina; SPX, Esparfloxacina
CLT, Cefalotina; FOX, Cefoxitina; ZOX, Ceftizoxima; CAZ, Ceftazidima
CTX, Cefotaxima; CRO, Ceftriaxona; IMP, Imipenem; MRP, Meropenem
GM, Gentamicina; TM, Tobramicina; AMK, Amikacina; TC, Tetraciclina
ACR, Acriflavina; BE, Bromuro de Etidio; NOV, Novobiocina
MTC, Mitomicina-C; CCCP, Carbonil cianuro *m*-clorofenilhidrazona

TABLA 56.- COEFICIENTES DE SPEARMAN (CS) DEL CONJUNTO DE MUTANTES DE *E. COLI* SELECCIONADOS CON NOR (9 CEPAS) Y LMF (9 CEPAS)

	Antimicrobianos							
	NAL	NOR	LMF	TMF	CIP	OFX	SPX	CCCP
CS (NOR)	0,41	1,00	0,77	0,72	0,74	0,67	0,66	- 0,04
CS (LMF)	0,53	0,85	1,00	0,89	0,84	0,84	0,81	- 0,51
	Antimicrobianos							
	CLT	FOX	ZOX	CAZ	CTX	CRO	IPM	MRP
CS (NOR)	- 0,73	- 0,57	- 0,05	0,00	0,20	- 0,41	-0,08	- 0,12
CS (LMF)	0,25	- 0,25	0,64	- 0,65	- 0,56	0,50	-0,64	- 0,53
	Antimicrobianos							
	GM	TM	AMK	TC	ACR	BE	NOV	MTC
CS (NOR)	- 0,23	- 0,28	- 0,13	0,23	0,38	0,53	0,72	0,30
CS (LMF)	0,12	0,17	0,42	- 0,71	- 0,26	0,00	0,25	0,10

NAL, Ácido nalidíxico; NOR, Norfloxacina; LMF, Lomefloxacina
TMF, Temafloxacina; CIP, Ciprofloxacina; OFX, Ofloxacina; SPX, Esparfloxacina
CLT, Cefalotina; FOX, Cefoxitina; ZOX, Ceftizoxima; CAZ, Ceftazidima
CTX, Cefotaxima; CRO, Ceftriaxona; IMP, Imipenem; MRP, Meropenem
GM, Gentamicina; TM, Tobramicina; AMK, Amikacina; TC, Tetraciclina
ACR, Acriflavina; BE, Bromuro de Etidio; NOV, Novobiocina
MTC, Mitomicina-C; CCCP, Carbonil cianuro *m*-clorofenilhidrazona

TABLA 57A.- CORRELACIÓN DE SPEARMAN REALIZADA CON LAS CEPAS ORIGEN DE *ESCHERICHIA COLI* (PARTE A)

	NAL	NOR	LMF	TMF	CIP	OFX	SPX	CLT	FOX	CAZ	CTX	ZOX
NAL	1,00	0,77	0,86	0,27	0,63	0,58	0,34	0,17	-0,47	0,16	0,05	0,52
NOR	0,77	1,00	0,74	0,38	0,52	0,54	0,42	0,17	-0,37	0,26	-0,09	0,26
LMF	0,86	0,74	1,00	0,56	0,82	0,73	0,66	0,19	-0,64	0,36	-0,17	0,52
TMF	0,27	0,38	0,56	1,00	0,81	0,68	0,96	-0,14	-0,80	0,36	-0,36	0,44
CIP	0,63	0,52	0,82	0,81	1,00	0,92	0,88	-0,15	-0,86	0,29	-0,33	0,55
OFX	0,58	0,54	0,73	0,68	0,92	1,00	0,73	-0,12	-0,79	0,18	-0,34	0,37
SPX	0,34	0,42	0,66	0,96	0,88	0,73	1,00	-0,19	-0,79	0,37	-0,49	0,42
CLT	0,17	0,17	0,19	-0,14	-0,15	-0,12	-0,19	1,00	0,19	0,19	0,45	0,32
FOX	-0,47	-0,37	-0,64	-0,80	-0,86	-0,79	-0,79	0,19	1,00	0,08	0,45	-0,33
CAZ	0,16	0,26	0,36	0,36	0,29	0,18	0,37	0,19	0,08	1,00	0,44	0,42
CTX	0,05	-0,09	-0,17	-0,36	-0,33	-0,34	-0,49	0,45	0,45	0,44	1,00	0,26
ZOX	0,52	0,26	0,52	0,44	0,55	0,37	0,42	0,32	-0,33	0,42	0,26	1,00
CRO	0,21	0,05	0,29	-0,28	0,11	0,11	0,00	-0,11	0,17	0,00	-0,36	-0,10
IMP	0,41	0,10	0,23	-0,17	0,28	0,47	-0,16	0,11	-0,17	0,00	0,36	0,10
MRP	0,10	0,28	-0,15	-0,24	-0,11	0,21	-0,35	0,10	0,02	-0,34	0,18	-0,20
TC	0,08	0,00	-0,15	-0,81	-0,45	-0,34	-0,72	0,25	0,66	0,01	0,47	-0,10
GM	0,29	0,29	0,56	0,43	0,41	0,40	0,38	0,61	-0,35	0,57	0,30	0,45
TM	0,50	0,29	0,56	0,43	0,41	0,22	0,38	0,36	-0,35	0,57	0,42	0,45
AMK	0,24	0,20	0,39	0,50	0,45	0,35	0,56	-0,05	-0,09	0,64	-0,09	0,56
ACR	0,33	-0,23	0,26	-0,10	0,15	-0,02	0,01	-0,19	0,03	0,22	0,19	0,39
BE	0,03	0,10	0,04	-0,07	0,00	0,03	-0,14	0,34	0,25	0,55	0,64	0,52
NOV	0,31	0,19	0,05	-0,15	-0,01	-0,09	-0,26	0,28	0,11	0,23	0,75	0,53
MTC	-0,63	-0,42	-0,51	-0,48	-0,56	-0,35	-0,50	0,00	0,33	-0,29	0,00	-0,74
CCCP	-0,14	-0,39	-0,28	0,00	-0,20	-0,29	-0,17	-0,27	0,00	0,05	0,41	0,00

TABLA 57B.- CORRELACIÓN DE SPEARMAN REALIZADA CON LAS CEPAS ORIGEN DE *ESCHERICHIA COLI* (PARTE B)

	CRO	IMP	MRP	TC	GM	TM	AMK	ACR	BE	NOV	MTC	CCCP
NAL	0,21	0,41	0,10	0,08	0,29	0,50	0,24	0,33	0,03	0,31	-0,63	-0,14
NOR	0,05	0,10	0,28	0,00	0,29	0,29	0,20	-0,23	0,10	0,19	-0,42	-0,39
LMF	0,29	0,23	-0,15	-0,15	0,56	0,56	0,39	0,26	0,04	0,05	-0,51	-0,28
TMF	-0,28	-0,17	-0,24	-0,81	0,43	0,43	0,50	-0,10	-0,07	-0,15	-0,48	0,00
CIP	0,11	0,28	-0,11	-0,45	0,41	0,41	0,45	0,15	0,00	-0,01	-0,56	-0,20
OFX	0,11	0,47	0,21	-0,34	0,40	0,22	0,35	-0,02	0,03	-0,09	-0,35	-0,29
SPX	0,00	-0,16	-0,35	-0,72	0,38	0,38	0,56	0,01	-0,14	-0,26	-0,50	-0,17
CLT	-0,11	0,11	0,10	0,25	0,61	0,36	-0,05	-0,19	0,34	0,28	0,00	-0,27
FOX	0,17	-0,17	0,02	0,66	-0,35	-0,35	-0,09	0,03	0,25	0,11	0,33	0,00
CAZ	0,00	0,00	-0,34	0,01	0,57	0,57	0,64	0,22	0,55	0,23	-0,29	0,05
CTX	-0,36	0,36	0,18	0,47	0,30	0,42	-0,09	0,19	0,64	0,75	0,00	0,41
ZOX	-0,10	0,10	-0,20	-0,10	0,45	0,45	0,56	0,39	0,52	0,53	-0,74	0,00
CRO	1,00	0,10	-0,36	0,46	-0,19	-0,19	0,17	0,39	-0,19	-0,32	0,00	-0,58
IMP	0,10	1,00	0,51	0,36	0,19	0,19	-0,17	0,17	0,19	0,32	0,00	0,00
MRP	-0,36	0,51	1,00	0,24	-0,07	-0,36	-0,38	-0,53	0,23	0,25	0,24	-0,08
TC	0,46	0,36	0,24	1,00	-0,15	-0,24	-0,30	0,15	0,43	0,44	0,27	-0,28
GM	-0,19	0,19	-0,07	-0,15	1,00	0,63	0,22	0,00	0,45	0,13	0,00	0,00
TM	-0,19	0,19	-0,36	-0,24	0,63	1,00	0,22	0,33	0,04	0,28	-0,43	0,30
AMK	0,17	-0,17	-0,38	-0,30	0,22	0,22	1,00	0,40	0,22	-0,16	-0,64	-0,03
ACR	0,39	0,17	-0,53	0,15	0,00	0,33	0,40	1,00	0,04	0,10	-0,38	0,40
BE	-0,19	0,19	0,23	0,43	0,45	0,04	0,22	0,04	1,00	0,65	0,00	0,00
NOV	-0,32	0,32	0,25	0,44	0,13	0,28	-0,16	0,10	0,65	1,00	-0,29	0,15
MTC	0,00	0,00	0,24	0,27	0,00	-0,43	-0,64	-0,38	0,00	-0,29	1,00	0,00
CCCP	-0,58	0,00	-0,08	-0,28	0,00	0,30	-0,03	0,40	0,00	0,15	0,00	1,00

Mapa de Correlación de Spearman correspondiente a la Tabla 57

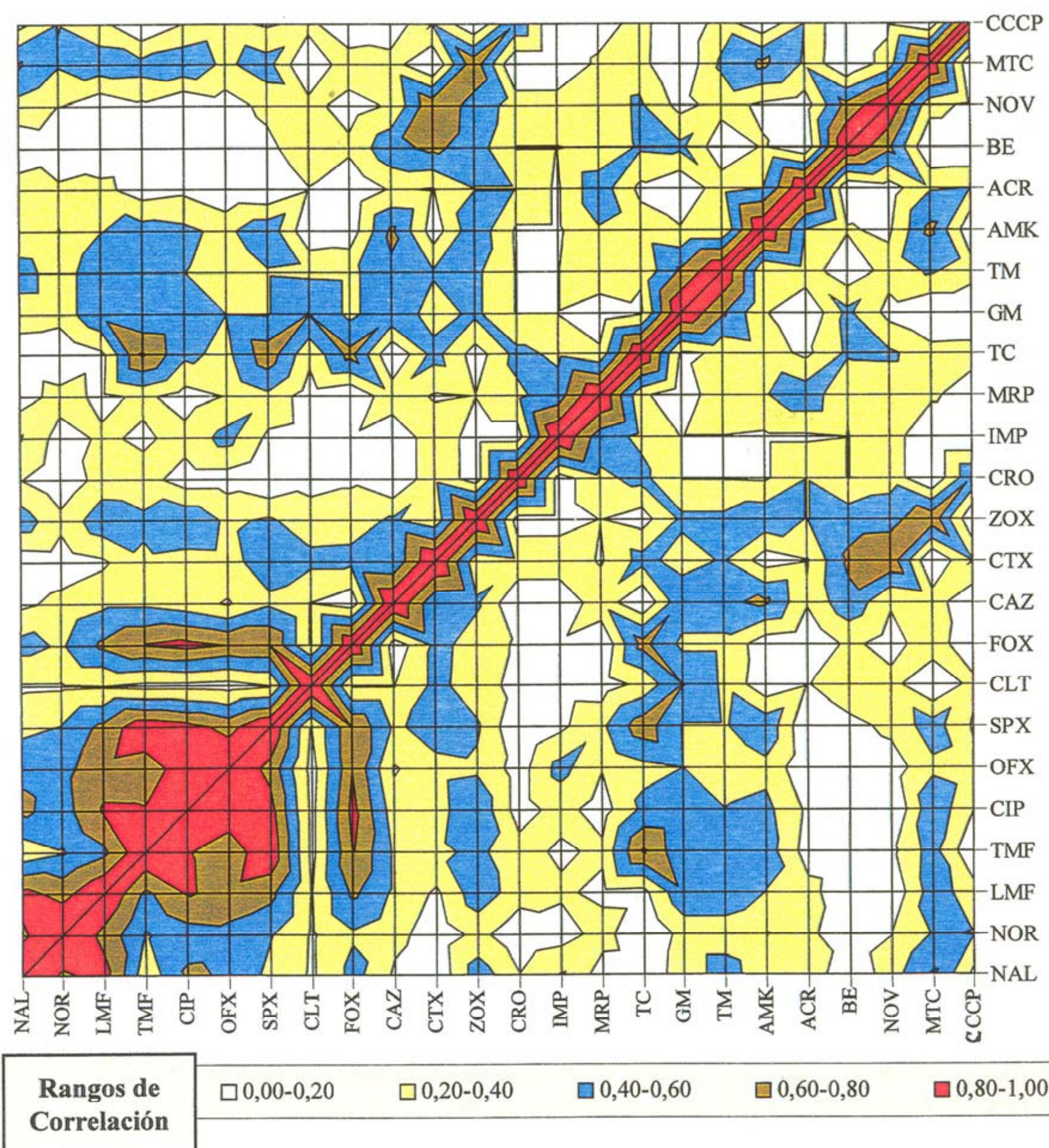


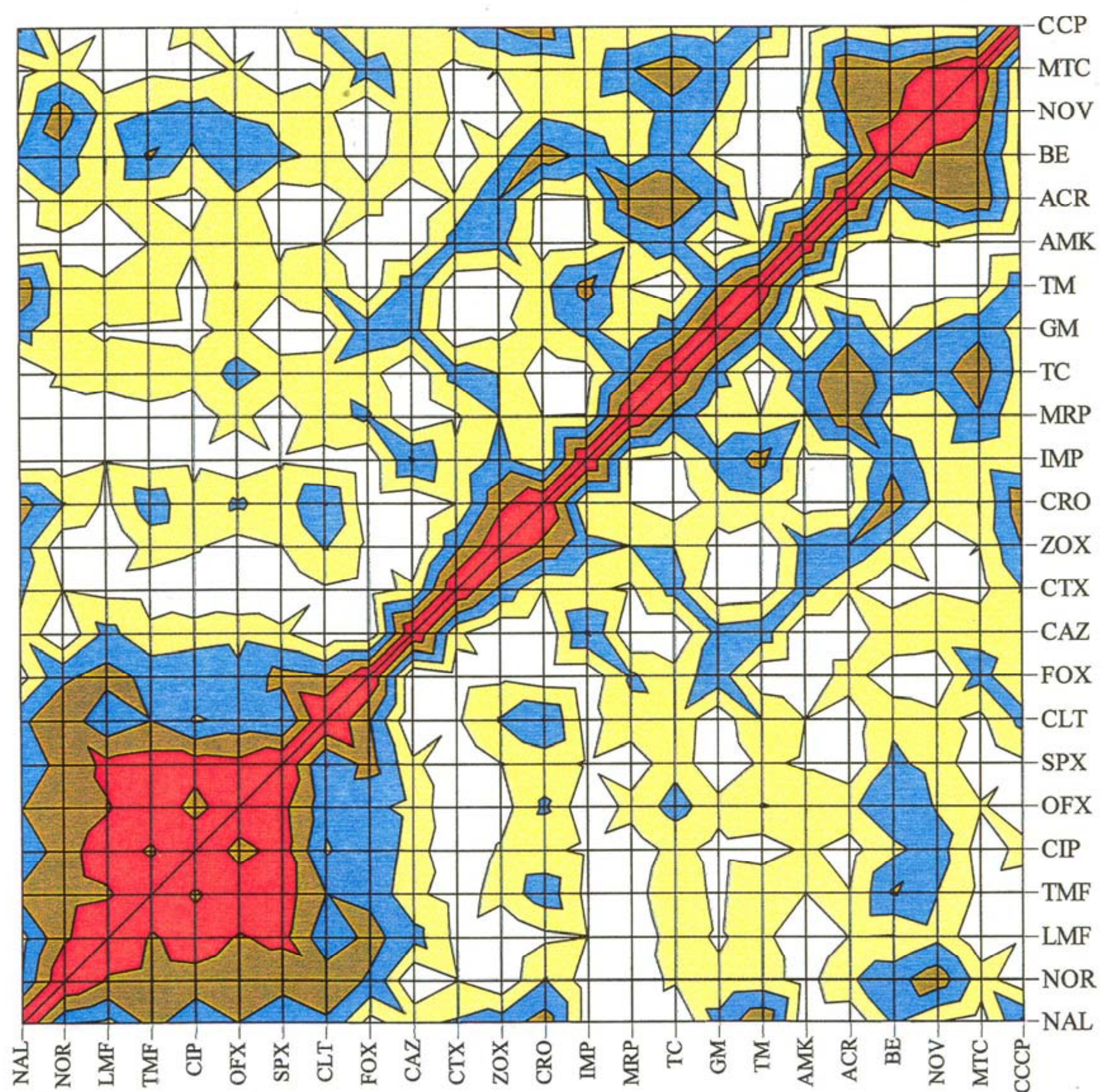
TABLA 58A.- CORRELACIÓN DE SPEARMAN REALIZADA CON LAS CEPAS MUTANTES DE *ESCHERICHIA COLI* SELECCIONADAS CON NOR (PARTE A)

	NAL	NOR	LMF	TMF	CIP	OFX	SPX	CLT	FOX	CAZ	CTX	ZOX
NAL	1,00	0,41	0,33	0,67	0,39	0,60	0,49	-0,57	-0,11	-0,35	-0,43	-0,50
NOR	0,41	1,00	0,77	0,72	0,74	0,67	0,66	-0,73	-0,57	0,00	0,20	-0,05
LMF	0,33	0,77	1,00	0,77	0,90	0,78	0,86	-0,44	-0,67	-0,47	0,14	0,00
TMF	0,67	0,72	0,77	1,00	0,77	0,97	0,90	-0,60	-0,55	-0,24	-0,12	-0,28
CIP	0,39	0,74	0,90	0,77	1,00	0,71	0,89	-0,37	-0,59	-0,28	-0,06	-0,23
OFX	0,60	0,67	0,78	0,97	0,71	1,00	0,86	-0,47	-0,44	-0,34	-0,01	-0,10
SPX	0,49	0,66	0,86	0,90	0,89	0,86	1,00	-0,39	-0,68	-0,24	0,05	-0,19
CLT	-0,57	-0,73	-0,44	-0,60	-0,37	-0,47	-0,39	1,00	0,62	0,00	0,18	0,42
FOX	-0,11	-0,57	-0,67	-0,55	-0,59	-0,44	-0,68	0,62	1,00	0,00	-0,12	0,15
CAZ	-0,35	0,00	-0,47	-0,24	-0,28	-0,34	-0,24	0,00	0,00	1,00	0,24	0,00
CTX	-0,43	0,20	0,14	-0,12	-0,06	-0,01	0,05	0,18	-0,12	0,24	1,00	0,55
ZOX	-0,50	-0,05	0,00	-0,28	-0,23	-0,10	-0,19	0,42	0,15	0,00	0,55	1,00
CRO	-0,70	-0,41	-0,16	-0,53	-0,24	-0,44	-0,28	0,61	0,05	0,00	0,20	0,75
IMP	-0,10	-0,08	-0,19	0,14	0,15	0,02	0,17	0,11	-0,04	0,61	-0,24	-0,46
MRP	-0,12	-0,12	-0,09	0,12	-0,09	0,27	-0,06	0,35	0,43	0,00	-0,17	0,40
TC	0,00	0,23	0,27	0,33	0,26	0,48	0,34	0,35	0,27	0,00	0,48	0,40
GM	-0,47	-0,23	-0,18	-0,15	-0,13	-0,27	-0,02	-0,05	-0,53	0,47	-0,02	-0,14
TM	-0,76	-0,28	-0,28	-0,38	-0,09	-0,41	-0,24	0,40	0,03	0,53	0,04	-0,01
AMK	-0,05	-0,13	0,00	0,21	-0,23	0,36	0,16	0,20	0,00	0,00	0,50	0,46
ACR	-0,04	0,38	0,21	0,20	0,12	0,36	0,04	0,08	0,31	0,00	0,23	0,60
BE	0,43	0,53	0,19	0,63	0,35	0,58	0,44	-0,37	-0,04	0,40	0,03	-0,34
NOV	0,21	0,72	0,34	0,41	0,50	0,38	0,34	-0,26	0,00	0,35	0,17	0,00
MTC	0,11	0,30	-0,05	0,16	0,11	0,22	0,02	0,14	0,48	0,34	0,12	0,21
CCCP	0,63	-0,04	-0,18	0,14	-0,24	0,10	-0,17	-0,48	0,19	-0,28	-0,41	-0,61

TABLA 58B.- CORRELACIÓN DE SPEARMAN REALIZADA CON LAS CEPAS MUTANTES DE *ESCHERICHIA COLI* SELECCIONADAS CON NOR (PARTE B)

	CRO	IMP	MRP	TC	GM	TM	AMK	ACR	BE	NOV	MTC	CCCP
NAL	-0,70	-0,10	-0,12	0,00	-0,47	-0,76	-0,05	-0,04	0,43	0,21	0,11	0,63
NOR	-0,41	-0,08	-0,12	0,23	-0,23	-0,28	-0,13	0,38	0,53	0,72	0,30	-0,04
LMF	-0,16	-0,19	-0,09	0,27	-0,18	-0,28	0,00	0,21	0,19	0,34	-0,05	-0,18
TMF	-0,53	0,14	0,12	0,33	-0,15	-0,38	0,21	0,20	0,63	0,41	0,16	0,14
CIP	-0,24	0,15	-0,09	0,26	-0,13	-0,09	-0,23	0,12	0,35	0,50	0,11	-0,24
OFX	-0,44	0,02	0,27	0,48	-0,27	-0,41	0,36	0,36	0,58	0,38	0,22	0,10
SPX	-0,28	0,17	-0,06	0,34	-0,02	-0,24	0,16	0,04	0,44	0,34	0,02	-0,17
CLT	0,61	0,11	0,35	0,35	-0,05	0,40	0,20	0,08	-0,37	-0,26	0,14	-0,48
FOX	0,05	-0,04	0,43	0,27	-0,53	0,03	0,00	0,31	-0,04	0,00	0,48	0,19
CAZ	0,00	0,61	0,00	0,00	0,47	0,53	0,00	0,00	0,40	0,35	0,34	-0,28
CTX	0,20	-0,24	-0,17	0,48	-0,02	0,04	0,50	0,23	0,03	0,17	0,12	-0,41
ZOX	0,75	-0,46	0,40	0,40	-0,14	-0,01	0,46	0,60	-0,34	0,00	0,21	-0,61
CRO	1,00	-0,20	0,20	-0,05	0,28	0,34	0,10	0,11	-0,70	-0,35	-0,20	-0,75
IMP	-0,20	1,00	0,20	0,11	0,46	0,67	-0,13	-0,16	0,55	0,29	0,28	-0,21
MRP	0,20	0,20	1,00	0,57	-0,23	0,19	0,37	0,74	0,29	0,21	0,59	-0,21
TC	-0,05	0,11	0,57	1,00	-0,49	-0,01	0,53	0,70	0,52	0,53	0,72	-0,33
GM	0,28	0,46	-0,23	-0,49	1,00	0,59	0,02	-0,56	-0,19	-0,40	-0,55	-0,29
TM	0,34	0,67	0,19	-0,01	0,59	1,00	-0,24	-0,06	0,00	0,07	0,07	-0,54
AMK	0,10	-0,13	0,37	0,53	0,02	-0,24	1,00	0,24	0,15	-0,22	0,05	-0,08
ACR	0,11	-0,16	0,74	0,70	-0,56	-0,06	0,24	1,00	0,37	0,62	0,78	-0,27
BE	-0,70	0,55	0,29	0,52	-0,19	0,00	0,15	0,37	1,00	0,74	0,68	0,17
NOV	-0,35	0,29	0,21	0,53	-0,40	0,07	-0,22	0,62	0,74	1,00	0,83	-0,20
MTC	-0,20	0,28	0,59	0,72	-0,55	0,07	0,05	0,78	0,68	0,83	1,00	-0,16
CCCP	-0,75	-0,21	-0,21	-0,33	-0,29	-0,54	-0,08	-0,27	0,17	-0,20	-0,16	1,00

Mapa de Correlación de Spearman correspondiente a la Tabla 58



Rangos de Correlación	□ 0,00-0,20	□ 0,20-0,40	■ 0,40-0,60	■ 0,60-0,80	■ 0,80-1,00

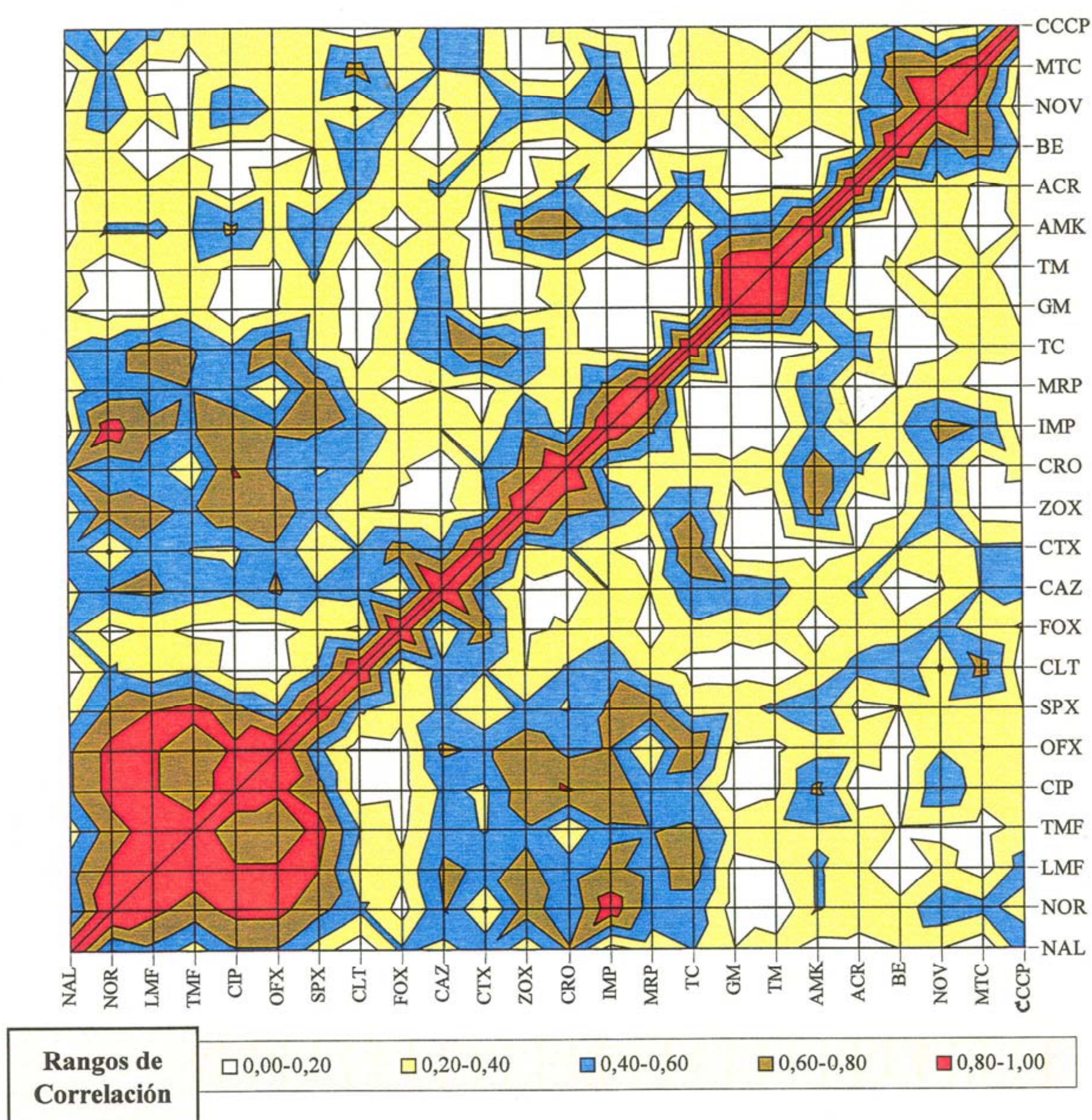
TABLA 59A.- CORRELACIÓN DE SPEARMAN REALIZADA CON LAS CEPAS MUTANTES DE *ESCHERICHIA COLI* SELECCIONADAS CON LMF (PARTE A)

	NAL	NOR	LMF	TMF	CIP	OFX	SPX	CLT	FOX	CAZ	CTX	ZOX
NAL	1,00	0,37	0,53	0,30	0,58	0,58	0,29	-0,04	-0,44	-0,31	-0,56	0,26
NOR	0,37	1,00	0,85	0,71	0,87	0,87	0,66	0,44	0,11	-0,60	-0,17	0,71
LMF	0,53	0,85	1,00	0,89	0,84	0,84	0,81	0,25	-0,25	-0,65	-0,56	0,64
TMF	0,30	0,71	0,89	1,00	0,60	0,60	0,88	0,40	-0,15	-0,51	-0,38	0,57
CIP	0,58	0,87	0,84	0,60	1,00	0,84	0,68	0,08	-0,12	-0,44	-0,37	0,75
OFX	0,58	0,87	0,84	0,60	0,84	1,00	0,45	0,08	-0,12	-0,64	-0,56	0,75
SPX	0,29	0,66	0,81	0,88	0,68	0,45	1,00	0,43	-0,25	-0,43	-0,24	0,45
CLT	-0,04	0,44	0,25	0,40	0,08	0,08	0,43	1,00	0,17	-0,46	0,41	-0,20
FOX	-0,44	0,11	-0,25	-0,15	-0,12	-0,12	-0,25	0,17	1,00	0,20	0,69	0,17
CAZ	-0,31	-0,60	-0,65	-0,51	-0,44	-0,64	-0,43	-0,46	0,20	1,00	0,45	-0,14
CTX	-0,56	-0,17	-0,56	-0,38	-0,37	-0,56	-0,24	0,41	0,69	0,45	1,00	-0,31
ZOX	0,26	0,71	0,64	0,57	0,75	0,75	0,45	-0,20	0,17	-0,14	-0,31	1,00
CRO	0,62	0,43	0,50	0,23	0,81	0,54	0,39	-0,43	-0,23	0,00	-0,42	0,64
IMP	-0,10	-0,92	-0,64	-0,58	-0,75	-0,61	-0,62	-0,55	-0,35	0,40	-0,21	-0,59
MRP	0,29	-0,51	-0,53	-0,59	-0,49	-0,19	-0,74	-0,28	-0,11	0,20	-0,10	-0,38
TC	-0,41	-0,51	-0,71	-0,62	-0,44	-0,79	-0,30	0,11	0,36	0,53	0,80	-0,58
GM	0,20	-0,11	0,12	0,32	0,04	-0,17	0,34	-0,09	-0,26	0,56	-0,03	0,15
TM	0,30	-0,03	0,17	0,33	0,15	-0,14	0,43	0,00	-0,31	0,49	0,00	0,11
AMK	0,10	0,42	0,42	0,38	0,65	0,32	0,54	-0,25	-0,11	0,27	-0,09	0,71
ACR	0,12	-0,32	-0,26	-0,35	0,03	-0,33	-0,14	-0,47	0,26	0,44	0,16	-0,04
BE	0,21	0,29	0,00	0,18	0,09	0,09	0,19	0,57	0,27	0,00	0,42	0,14
NOV	0,19	0,57	0,25	0,17	0,61	0,39	0,34	0,17	0,46	-0,17	0,26	0,55
MTC	0,05	0,46	0,10	0,13	0,27	0,19	0,29	0,68	0,29	-0,41	0,42	0,07
CCCP	-0,57	-0,28	-0,51	-0,26	-0,37	-0,37	-0,20	-0,07	0,17	0,49	0,43	0,06

TABLA 59B.- CORRELACIÓN DE SPEARMAN REALIZADA CON LAS CEPAS MUTANTES DE *ESCHERICHIA COLI* SELECCIONADAS CON LMF (PARTE B)

	CRO	IMP	MRP	TC	GM	TM	AMK	ACR	BE	NOV	MTC	CCCP
NAL	0,62	-0,10	0,29	-0,41	0,20	0,30	0,10	0,12	0,21	0,19	0,05	-0,57
NOR	0,43	-0,92	-0,51	-0,51	-0,11	-0,03	0,42	-0,32	0,29	0,57	0,46	-0,28
LMF	0,50	-0,64	-0,53	-0,71	0,12	0,17	0,42	-0,26	0,00	0,25	0,10	-0,51
TMF	0,23	-0,58	-0,59	-0,62	0,32	0,33	0,38	-0,35	0,18	0,17	0,13	-0,26
CIP	0,81	-0,75	-0,49	-0,44	0,04	0,15	0,65	0,03	0,09	0,61	0,27	-0,37
OFX	0,54	-0,61	-0,19	-0,79	-0,17	-0,14	0,32	-0,33	0,09	0,39	0,19	-0,37
SPX	0,39	-0,62	-0,74	-0,30	0,34	0,43	0,54	-0,14	0,19	0,34	0,29	-0,20
CLT	-0,43	-0,55	-0,28	0,11	-0,09	0,00	-0,25	-0,47	0,57	0,17	0,68	-0,07
FOX	-0,23	-0,35	-0,11	0,36	-0,26	-0,31	-0,11	0,26	0,27	0,46	0,29	0,17
CAZ	0,00	0,40	0,20	0,53	0,56	0,49	0,27	0,44	0,00	-0,17	-0,41	0,49
CTX	-0.42	-0,21	-0,10	0,80	-0,03	0,00	-0,09	0,16	0,42	0,26	0,42	0,43
ZOX	0,64	-0,59	-0,38	-0,58	0,15	0,11	0,71	-0,04	0,14	0,55	0,07	0,06
CRO	1.00	-0,32	-0,23	-0,22	0,22	0,31	0,72	0,46	-0,10	0,51	-0,05	-0,28
IMP	-0,32	1.00	0,66	0,16	0,10	0,00	-0,47	0,20	-0,36	-0,67	-0,59	0,10
MRP	-0,23	0,66	1,00	0,02	-0,12	-0,17	-0,59	0,02	0,18	-0,29	-0,14	0,06
TC	-0,22	0,16	0,02	1,00	-0,01	0,06	-0,14	0,54	0,13	0,15	0,24	0,25
GM	0,22	0,10	-0,12	-0,01	1,00	0,97	0,51	0,12	0,18	-0,22	-0,38	0,15
TM	0,31	0,00	-0,17	0,06	0,97	1,00	0,54	0,16	0,22	-0,13	-0,25	0,06
AMK	0,72	-0,47	-0,59	-0,14	0,51	0,54	1,00	0,15	0,00	0,39	-0,05	0,23
ACR	0,46	0,20	0,02	0,54	0,12	0,16	0,15	1,00	-0,18	0,33	-0,15	-0,22
BE	-0,10	-0,36	0,18	0,13	0,18	0,22	0,00	-0,18	1,00	0,51	0,73	0,38
NOV	0,51	-0,67	-0,29	0,15	-0,22	-0,13	0,39	0,33	0,51	1,00	0,73	0,09
MTC	-0,05	-0,59	-0,14	0,24	-0,38	-0,25	-0,05	-0,15	0,73	0,73	1,00	0,20
CCCP	-0,28	0,10	0,06	0,25	0,15	0,06	0,23	-0,22	0,38	0,09	0,20	1,00

Mapa de Correlación de Spearman correspondiente a la Tabla 59



Rangos de Correlación

□ 0,00-0,20 □ 0,20-0,40 ■ 0,40-0,60 ■ 0,60-0,80 ■ 0,80-1,00

7.6 - SUSCEPTIBILIDADES DE OTRAS ENTEROBACTERIAS RELACIONADAS Y SUS MUTANTES. FRECUENCIA DE SELECCIÓN A QUINOLONAS

Se ha trabajado en este estudio con otras enterobacterias no pertenecientes a la especie *Escherichia coli.*

Las especies elegidas han sido de las más características dentro de esta familia y se presentan a continuación junto con su número de cepa asociado al que haremos referencia en adelante para referirnos a ellas.

Nº de Cepa	Especie
12	*Citrobacter diversus*
13	*Citrobacter freundii*
14	*Enterobacter cloacae*
15	*Enterobacter cloacae*
16	*Klebsiella pneumoniae*
17	*Proteus vulgaris*
18	*Salmonella enteritidis* *

(* serotipo)

Las pruebas bioquímicas de identificación API 20E (DIFCO) realizada a estas cepas se presentan en la tabla 60. Dichas cepas origen y sus susceptibilidades iniciales se presentan en la tabla 61. Junto con el nombre de la especie se pone el código o número. La letra a continuación del número indica, al igual que para la especie *E. coli,* P para las cepas origen, N para las cepas mutantes seleccionadas con norfloxacina y L para las cepas mutantes seleccionadas con lomefloxacina.

Como se puede observar en dicha tabla 61, el conjunto de cepas origen presentan una alta susceptibilidad a todas las quinolonas en general, salvo la cepa 13P que presenta una susceptibilidad media a ofloxacina y temafloxacina. De igual manera, el imipenem, presenta una alta actividad frente a todo el grupo excepto con la cepa 17P, frente a la que presenta una actividad media. Las cefalosporinas presentan una actividad variable dependiendo de la generación a que pertenezcan y sobre la cepa en concreto que se utilice.

En la tabla 62 se exponen las susceptibilidades del mismo conjunto de cepas origen frente a otros antimicrobianos y, además, se exponen también las susceptibilidades que han presentado frente a ellos sus cepas mutantes seleccionadas con norfloxacina y lomefloxacina.

Como se puede apreciar en dicha tabla, las cepas mutantes han aumentado su nivel de resistencia para las quinolonas, β-lactámicos y tetraciclina; no así para los aminoglucósidos ni el imipenem. En éste y otros antibacterianos ensayados, dependiendo de la cepa mutante, incluso ha aumentado el nivel de susceptibilidad de dicha cepa respecto a la cepa origen.

En las tablas 63 y 64 se han incluido las frecuencias de selección con norfloxacina y lomefloxacina de los mutantes seleccionados a partir de las cepas 12P a 18P con dichos antimicrobianos. En ambos casos, se consiguió obtener mutantes de todas las cepas bajo estudio en tres escalones selectivos.

El incremento en el nivel de resistencia osciló entre 32 y 512 veces el nivel original para ambos antibacterianos.

TABLA 60.- PRUEBAS BIOQUÍMICAS API 20E DE LAS 7 CEPAS ORIGEN DE OTRAS ENTEROBACTERIAS DIFERENTES DE *E. COLI* UTILIZADAS EN ESTE ESTUDIO

Prueba		12	13	14	15	16	17	18
β-Galactosidasa	ONPG	+	+	+	+	+	–	–
Arginina–dihidrolasa	ADH	+	+	+	+	–	–	+
Lisina–descarboxilasa	LDC	–	–	–	–	+	–	+
Ornitina–descarboxilasa	ODC	+	–	+	+	–	–	+
Citrato de Simmons	CIT	+	–	+	+	+	–	–
Formación de SH_2	SH_2	–	+	–	–	–	+	+
Ureasa	URE	–	–	–	–	+	+	–
Triptófano–desaminasa	TDA	–	–	–	–	–	+	–
Indol	IND	+	–	–	–	–	+	–
Voges Proskauer	VP	–	–	+	–	+	–	–
Hidrólisis de la Gelatina	GEL	–	–	–	–	–	–	–
Fermentación de azúcares:								
Glucosa	GLU	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	MAN	+	+	+	+	+	–	+
Inositol	INO	–	–	+	+	+	–	–
Sorbitol	SOR	+	–	+	+	+	–	+
Rhamnosa	RHA	+	+	+	+	+	–	+
Sacarosa	SAC	+	+	+	+	+	+	–
Melibiosa	MEL	–	–	+	+	+	–	+
Amigdalina	AMY	+	–	+	+	+	–	–
Arabinosa	ARA	+	+	+	+	+	–	+
Oxidasa	OX	–	–	–	–	–	–	–
Red. Nitratos a Nitritos	NO_2	+	+	+	+	+	+	+
Movilidad	MOB	+	+	+	+	–	+	+
Crecimiento en MacConkey	McC	+	+	+	+	+	+	+

TABLA 61.- SUSCEPTIBILIDADES DEL CONJUNTO INICIAL DE 7 CEPAS ORIGEN DE OTRAS ENTEROBACTERIAS DIFERENTES DE *E. COLI*, FRENTE A DIVERSOS ANTIMICROBIANOS

CEPAS	Código	Antimicrobianos [1] => CMI (mg/l)							
		AN	AP	CIP	LMF	NOR	OFX	TMF	IMP
Citrobacter diversus	12P	8	2	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,12
Citrobacter freundii	13P	8	4	0,25	0,5	0,5	1	2	0,12
Enterobacter cloacae	14P	2	0,12	0,12	0,06	0,06	0,25	0,25	0,12
Enterobacter cloacae	15P	2	2	0,06	0,12	0,12	0,12	0,06	0,12
Klebsiella pneumoniae [2]	16P	0,25	0,25	0,06	0,12	0,12	0,25	0,12	0,12
Proteus vulgaris	17P	4	2	0,25	0,12	0,06	0,06	0,12	1
Salmonella enteritidis	18P	8	4	0,06	0,12	0,06	0,12	0,12	0,12

CEPAS	Código	Antimicrobianos [1] => CMI (mg/l)							
		CZ	CFX	CTX	FOX	HR	CAZ	ZOX	CRO
Citrobacter diversus	12P	0,5	0,06	0,12	2	0,06	0,12	0,06	0,25
Citrobacter freundii	13P	16	0,5	0,5	64	0,06	0,5	2	2
Enterobacter cloacae	14P	64	0,5	0,25	128	0,06	0,5	0,12	1
Enterobacter cloacae	15P	512	>512	32	>512	1	32	64	512
Klebsiella pneumoniae [2]	16P	2	0,12	0,12	2	0,12	0,06	0,06	1
Proteus vulgaris	17P	256	0,06	0,06	2	0,06	0,12	0,06	0,12
Salmonella enteritidis	18P	1	0,06	0,5	2	0,06	0,5	0,12	1

[1] AN = Ácido nalidíxico AP = Ácido pipemídico CIP = Ciprofloxacina LMF = Lomefloxacina
NOR = Norfloxacina OFX = Ofloxacina TMF = Temafloxacina CZ = Cefazolina
CFX = Cefixima CTX = Cefotaxima FOX = Cefoxitina HR = Cefpiroma
CAZ = Ceftazidima ZOX = Ceftizoxima CRO = Ceftriaxona IMP = Imipenem

[2] *Klebsiella pneumoniae* subespecie *pneumoniae*

TABLA 62.- SUSCEPTIBILIDADES DEL CONJUNTO INICIAL DE 7 ENTEROBACTERIAS NO *E. COLI*, SUS MUTANTES Y LOS CONTROLES, FRENTE A DIVERSOS ANTIMICROBIANOS

CEPA	NOR	LMF	TMF	CIP	OFX	SPX	CLT	FOX	CAZ	CTX	CRO	ZOX	IPM	GM	TM	AMK	TC
Ec130	0,25	0,06	0,06	0,06	0,06	0,12	128	128	0,5	1	1	0,12	2	4	4	2	4
P99	0,06	0,06	0,12	0,03	0,12	0,06	512	64	32	32	32	64	1	4	2	1	4
Cd145	0,25	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	4	4	0,5	0,06	2	1	0,25	0,12	0,06	1	2
Cf975	0,25	0,12	0,12	0,06	0,06	0,06	8	64	0,25	0,25	2	1	0,5	0,25	0,12	1	2
12P	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	4	2	0,12	0,12	0,25	0,06	0,12	0,25	0,06	1	4
12N	2	0,5	0,5	1	0,5	1	64	64	1	0,5	2	0,5	0,06	0,12	0,06	0,5	8
12L	8	4	4	1	4	2	512	256	2	2	4	1	0,06	0,12	0,06	0,5	32
13P	0,5	0,5	2	0,25	1	1	8	64	0,5	0,5	2	2	0,12	0,25	0,12	1	128
13N	64	64	128	64	64	64	128	256	4	4	4	2	0,12	0,5	0,12	1	1024
13L	64	64	256	64	64	128	8	4	4	4	4	2	0,25	0,25	0,06	2	512
14P	0,06	0,06	0,25	0,12	0,25	0,25	512	128	0,5	0,25	1	0,12	0,12	0,25	0,12	1	8
14N	64	32	64	16	32	16	1024	1024	4	4	8	4	0,5	0,12	0,06	1	64
14L	64	32	128	8	32	16	1024	512	4	4	8	4	2	0,25	0,06	1	64
15P	0,12	0,12	0,06	0,06	0,12	0,06	1024	512	32	32	512	64	0,12	0,5	0,25	2	8
15N	128	128	128	64	64	32	1024	1024	64	32	128	64	0,25	0,5	0,06	1	16
15L	64	64	128	32	64	16	256	128	128	128	512	128	0,12	0,25	0,06	2	32
16P	0,12	0,12	0,12	0,06	0,25	0,06	8	2	0,06	0,12	1	0,06	0,12	0,5	0,12	2	256
16N	128	128	128	32	64	32	256	128	0,5	1	2	0,5	0,5	0,25	0,06	1	8
16L	64	128	128	32	64	64	64	128	2	1	2	0,5	0,12	0,5	0,12	2	32
17P	0,06	0,12	0,12	0,25	0,06	0,12	8	2	0,12	0,06	0,12	0,06	1	0,25	0,12	1	64
17N	64	4	1	8	4	0,5	32	8	0,12	0,12	0,06	0,06	2	0,25	0,06	0,5	64
17L	4	32	16	4	8	16	128	4	0,12	2	32	0,12	2	0,5	0,12	0,5	64
18P	0,06	0,12	0,12	0,06	0,12	0,25	8	2	0,5	0,5	1	0,12	0,12	0,25	0,12	1	16
18N	32	32	8	8	4	64	64	128	4	4	4	2	0,06	0,12	0,12	1	32
18L	8	16	16	2	4	2	32	16	0,5	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25	0,5	0,5	16

SPX = Esparfloxacina; CLT = Cefalotina; GM = Gentamicina; TM = Tobramicina; AMK = Amikacina; TC = Tetracicilna. Resto de abreviaturas igual que en la tabla anterior. Ec130 = *Enterobacter cloacae* T ATCC 13047; P99 = *Enterobacter cloacae* NCIB 12091; Cd145 = *Citrobacter diversus* T CCUG 14559; Cf 975= *Citrobacter freundii* T NCTC 9750

TABLA 63.- FRECUENCIAS DE SELECCIÓN CON NORFLOXACINA EN OTRAS NTEROBACTERIAS DIFERENTES DE *E. COLI*

Cepa	CMI Origen	Paso 1			Paso 2			Paso 3		
		ν1	CMI 1	Δ1 CMI	ν2	CMI 2	Δ2 CMI	ν3	CMI 3	Δ3 CMI
12	0,06	$1\cdot10^{-9}$	0,12	2	$4\cdot10^{-5}$	0,5	8	$6\cdot10^{-7}$	2	32
13	0,5	---	---	---	$1\cdot10^{-7}$	2	4	$5\cdot10^{-6}$	16	32
14	0,06	$4\cdot10^{-8}$	0,25	4	$4\cdot10^{-7}$	4	64	$8\cdot10^{-6}$	16	256
15	0,12	$3\cdot10^{-8}$	0,5	4	$8\cdot10^{-7}$	4	32	$6\cdot10^{-6}$	32	256
16	0,12	$2\cdot10^{-8}$	1	8	$6\cdot10^{-7}$	16	128	$8\cdot10^{-6}$	64	512
17	0,06	$1\cdot10^{-8}$	0,25	4	$2\cdot10^{-6}$	1	16	$5\cdot10^{-7}$	8	128
18	0,06	$2\cdot10^{-7}$	0,25	4	$2\cdot10^{-8}$	2	32	$5\cdot10^{-6}$	8	128

CMI = Concentración Mínima Inhibitoria	ν = Frecuencia	Δ = Incremento acumulado

TABLA 64.- FRECUENCIAS DE SELECCIÓN CON LOMEFLOXACINA EN OTRAS ENTEROBACTERIAS DIFERENTES DE *E. COLI*

Cepa	CMI Origen	Paso 1			Paso 2			Paso 3		
		ν1	CMI 1	Δ1 CMI	ν2	CMI 2	Δ2 CMI	ν3	CMI 3	Δ3 CMI
12	0,06	$5\cdot10^{-7}$	0,12	2	$8\cdot10^{-6}$	0,5	8	$5\cdot10^{-6}$	2	32
13	0,5	$4\cdot10^{-8}$	1	2	$8\cdot10^{-7}$	8	16	$8\cdot10^{-6}$	64	128
14	0,06	$2\cdot10^{-8}$	0,5	8	$1\cdot10^{-8}$	4	64	$5\cdot10^{-8}$	32	512
15	0,12	$2\cdot10^{-8}$	1	8	$8\cdot10^{-7}$	4	32	$1\cdot10^{-7}$	32	256
16	0,12	$3\cdot10^{-8}$	2	16	$1\cdot10^{-7}$	16	128	$6\cdot10^{-6}$	64	512
17	0,12	$4\cdot10^{-8}$	0,25	2	$2\cdot10^{-8}$	2	16	$2\cdot10^{-6}$	4	32
18	0,12	$2\cdot10^{-7}$	0,25	2	$9\cdot10^{-9}$	1	8	$5\cdot10^{-8}$	8	64

(a) Paso 1 => CMI: 0,12 - 1 Paso 2 => CMI: 1 - 4 Paso 3 => CMI: 4 - 32

7.7 - ESTUDIO DE CAMBIOS EN LA MORFOLOGÍA DE LAS CEPAS DE *E. COLI*

Este estudio tuvo por objeto el identificar la presencia de posibles cambios en la morfología celular bacteriana asociados con el incremento de resistencia a quinolonas y ceftazidima en las cepas mutantes de *E. coli* seleccionadas, dado que está descrito que la presencia de quinolonas así como de β-lactámicos en los medios de cultivo conducen a la presencia de alteraciones morfológicas en las células bacterianas.

Tanto las cepas mutantes como sus respectivas cepas origen crecieron en medios de cultivo sin ningún antimicrobiano antes de realizar la tinción de Gram.

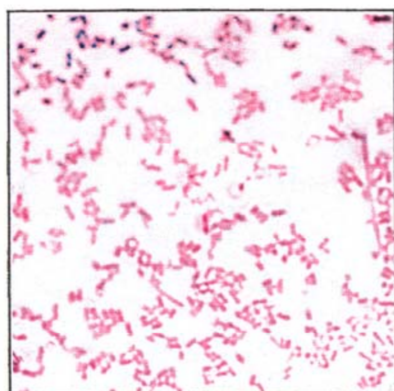
El resultado de dicho estudio fue que en el 62% de las cepas mutantes de *E. coli* se ha encontrado un alto grado de filamentación como queda reflejado en la tabla 65. En la página siguiente se expone una serie de tinciones de Gram donde se muestran algunos de estos cambios morfológicos.

En estas tinciones no hubo diferencias, entre la cepa origen y mutante, en la captación de la safranina.

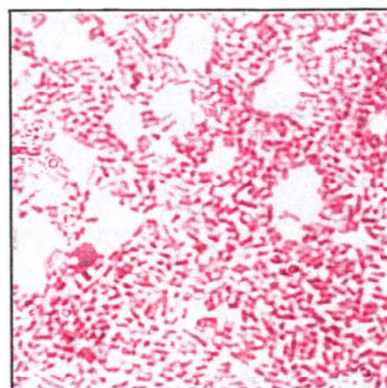
TABLA 65.- GRADO DE FILAMENTACIÓN (GF) [a]

Cepas	GF	Cepas	GF	Cepas	GF	Cepas	GF
1P	---	3P	---	6P	---	9P	---
1N	---	3N	+	6N	+++	9N	+++
1L	---	3L	+++	6L	+++	9L	+++
1C	+	4P	---	7P	---	10P	---
2P	---	4N	+++	7L	---	10N	+++
2N	+	4L	+++	7C	+	10L	+++
2L	+++	5P	---	8P	---	11P	---
		5N	+++	8N	+++	11C	+++
		5L	++				

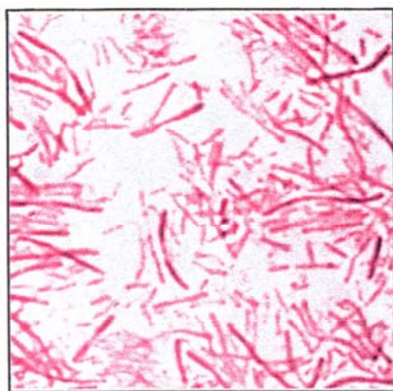
[a] --- : Sin filamentación ++ : Aumenta 3-4 veces su longitud
+ : Aumenta ≈2 veces su longitud +++ : Aumenta > 4 veces su longitud



E. coli 7P



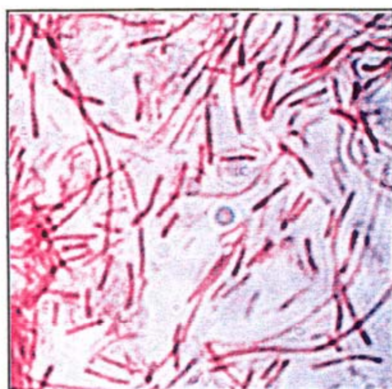
E. coli 11P



E. coli 7L



E. coli 11C



E. coli 7C

Figura 7.2.- Microscopía óptica de tinciones de Gram de cepas de *E. coli*

7.8 - VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIDROLÍTICA DE LAS β-LACTAMASAS PRESENTES EN EL EXTRACTO PERIPLÁSMICO

En este estudio se ha evaluado la cuantía de la actividad hidrolítica de los extractos periplásmicos no purificados obtenidos tanto de los mutantes seleccionados 7L, 7C y 11C, como de sus cepas origen 7P y 11P, frente a cefaloridina 100 µM y bencilpenicilina 100 µM en buffer fosfato 50 mM pH 7 y Tª de 25 °C.

La actividad de las β-lactamasas presentes en los extractos periplásmicos mencionados se expresó como actividad específica en µM_*S*/min/mg_*P* (*S*=sustrato hidrolizado, *P*=proteína).

Estos valores se muestran en la tabla 66.

TABLA 66.- ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS MUTANTES 7L Y 11C RESPECTO A SUS CEPAS ORIGEN (en µM_*S*/min/mg_*P*)[1]

Cepas	**Sustrato** (100 µM)	
	Bencilpenicilina	Cefaloridina
7P	700,1 ± 47,4	74,2 ± 3,6
7L	795,2 ± 57,1	77,3 ± 4,8
7C	ND [2]	ND [2]
11P	612 ± 17,8	89,2 ± 8,3
11C	519 ± 50,6	147,3 ± 18,3

[1] - *S* = sustrato hidrolizado, *P* = proteína [2] - No determinado

8 Resultados: Electroforesis de Proteínas.

1 - **Resumen de los perfiles electroforéticos de las proteínas de membrana externa (OMP) de las cepas de *Escherichia. coli.***

2 - **Resumen de los perfiles electroforéticos de las proteínas de membrana externa (OMP) de otras cepas de enterobacterias.**

3 - **Expresión de la porina F (OmpF) en las cepas de *Escherichia coli.***

Este capítulo se fundamenta en el papel que tiene la expresión de las porinas de la membrana externa en la resistencia a antimicrobianos, en especial debido al desarrollo del fenotipo de múltiple resistencia a antimicrobianos en mutantes Mar en *E. coli*, el cual ha sido asociado con la reducción de la expresión de la porina F (OmpF).

En este capítulo se exponen los resultados obtenidos al realizar la electroforesis en geles de poliacrilamida de las proteínas de la membrana externa de las cepas origen y mutantes objeto de este estudio.

Los extractos de proteínas de la membrana externa fueron obtenidos previamente tal como se indica en el capítulo de material y métodos

Los perfiles electroforéticos, tanto de las cepas control, como de las cepas origen de las enterobacterias referidas en este estudio, así como de sus cepas mutantes seleccionadas con lomefloxacina, norfloxacina o ceftazidima, y un patrón de peso molecular conocido, se exponen en las figuras de las páginas siguientes.

8.1 - Resumen de los perfiles electroforéticos de las proteínas de la membrana externa (OMP) de las cepas de *E. coli*

- Todas las cepas origen de la especie *E. coli* expresaron la porinas C, F y A.

- De los mutantes seleccionados con norfloxacina todos excepto las cepas 4N, 6N y 9N disminuyeron la expresión de la porina F respecto de sus cepas origen (figuras 8.4, 8.5 y 8.6).

- De los mutantes seleccionados con lomefloxacina sólo las cepas 2L, 3L, 4L, 5L y 9L no expresaron la porina F (figuras 8.3, 8.4 y

8.6), mientras que los 4 mutantes restantes, 1L, 6L, 7L y 10L, sí la expresaban (figuras 8.3, 8.5, 8.6 y 8.12).

- Ninguno de los mutantes seleccionados con ceftazidima expresó la porina F.

- Asimismo se detectó la pérdida de la porina C en las cepas mutantes 1N y 9L con respecto a sus cepas origen (figuras 8.3 y 8.4).

8.2 - RESUMEN DE LOS PERFILES ELECTROFORÉTICOS DE LAS PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA EXTERNA (OMP) DE OTRAS CEPAS DE ENTEROBACTERIAS

- La cepa mutante *Citrobacter diversus* 12N, se diferenció de la cepa origen 12P en que no expresó una proteína de 45 kDa, de peso molecular aparente en geles de poliacrilamida con urea, pero sí apreció un simultáneo incremento de la expresión de una proteína de 47 kDa, en el mismo tipo de geles (figura 8.10).

- La cepa mutante *Citrobacter freundii* 13L mostró el mismo perfil electroforético que la cepa origen 13P, sin embargo la cepa mutante 13N se diferenció de la 13L y 13P en que no expresó una proteína de 45 kDa, de peso molecular aparente en geles de poliacrilamida con urea, a la vez que desarrolló un incremento de la expresión de una proteína de 47 kDa, en el mismo tipo de geles (figura 8.11).

- Las cepas origen de *Enterobacter cloacae* 14P y 15P expresaron dos proteínas de membrana externa, una de 37 kDa (de peso molecular equivalente en geles de poliacrilamida con urea, y de movilidad electroforética coincidente con la descrita por otros autores en cepas de *E. cloacae* como OmpF) y otra de 40 kDa (de peso molecular equivalente en geles de poliacrilamida con urea, y de movilidad electroforética coincidente con la descrita por otros autores en cepas de *E. cloacae* como OmpD). Sin embargo, tanto las cepas mutantes 14N y 14L como la 15N fueron deficientes en la citada porina de 37 kDa (OmpF); además, la cepa 14N fue deficiente en la porina de 40 kDa (OmpD) ya mencionada (figuras 8.8, 8.9 y 8.10).

- Las cepas de *Klebsiella pneumoniae* 16P, 16N y 16L no expresaron una proteína de 37 kDa (probablemente OmpK37) que sí expresó la cepa control totalmente susceptible *K. pneumoniae* ATCC 10031. La cepa 16N fue además deficiente en una proteína de 36 kDa (probablemente OmpK36) (figura 8.7).

- La cepa origen de *Proteus vulgaris* 17P presentó una proteína de 37 kDa (42 kDa en geles de poliacrilamida con urea) en su membrana externa. Sin embargo, en la cepa 17L disminuyó la expresión de dicha proteína a la vez que se incrementó la expresión de otra proteína de 45 kDa de peso molecular aparente en geles de poliacrilamida con urea (figura 8.11).

- Tanto la cepa *Salmonella enteritidis* 18P como 18L presentaron el mismo perfil electroforético de proteínas de membrana externa (figura 8.11).

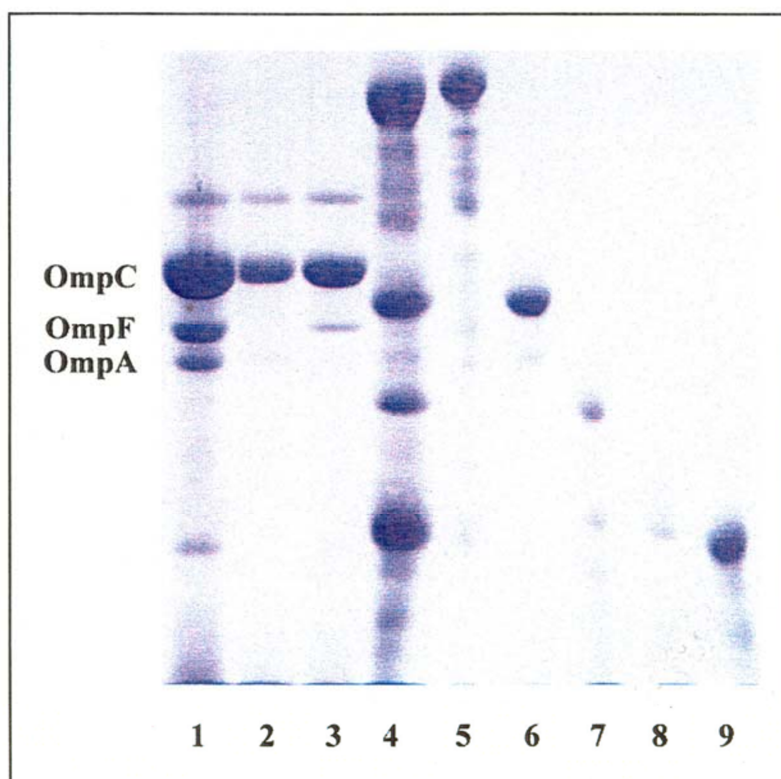


Figura 8.1. Perfiles electroforéticos de los extractos de proteínas de la membrana externa en gel de poliacrilamida al 10% suplementado con dodecil-sulfato-sódico (SDS) y urea.

Líneas:

1, *E. coli* KL16
2, *E. coli* JF703
3, *E. coli* JF699
4, Marcador de peso molecular: albúmina bovina (66 kDa), albúmina de huevo (45 kDa), gliceraldehído 3-P-deshidrogenasa de músculo de conejo (36 kDa), anhidrasa carbónica de eritrocitos bovinos (29 kDa), tripsinógeno de páncreas bovino tratado con PMSF (24 kDa)
5, albúmina bovina (66 kDa)
6, albúmina de huevo (45 kDa)
7, gliceraldehído 3-P-deshidrogenasa de músculo de conejo (36 kDa)
8, anhidrasa carbónica de eritrocitos bovinos (29 kDa)
9, tripsinógeno de páncreas bovino tratado con PMSF (24 kDa)



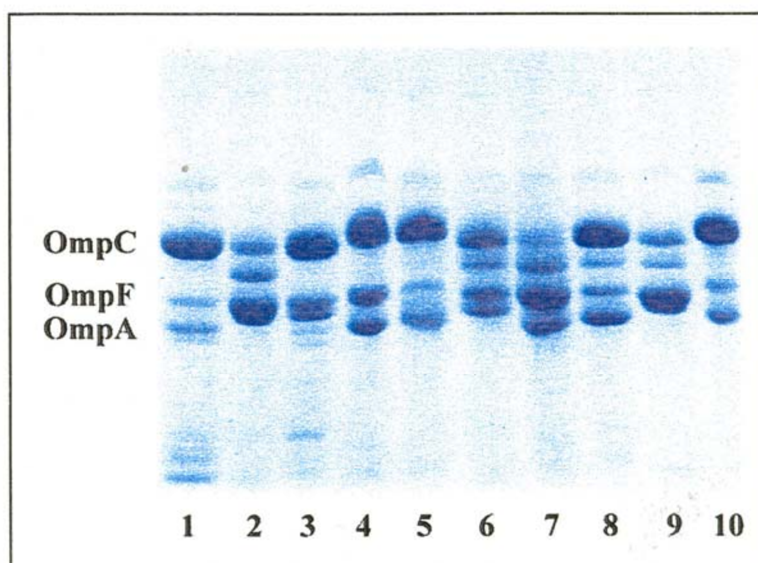


Figura 8.2. Perfiles electroforéticos de los extractos de proteínas de la membrana externa en gel de poliacrilamida al 10% suplementado con dodecil-sulfato-sódico y urea. Todas las líneas pertenecen a cepas origen de *E. coli*.

<u>*Líneas:*</u>

1, *E. coli* KL16; **2**, *E. coli* ATCC 25922; **3**, 1P; **4**, 2P; **5**, 3P; **6**, 4P; **7**, 5P; **8**, 6P; **9**, 7P; **10**, 8P.

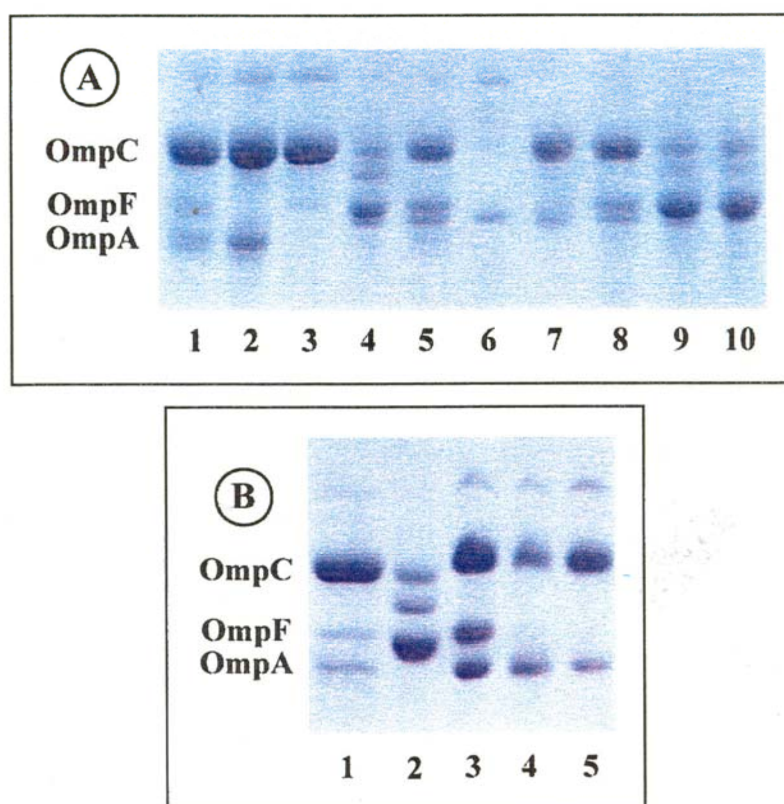


Figura 8.3. Perfiles electroforéticos de los extractos de proteínas de la membrana externa en gel de poliacrilamida al 10% suplementado con dodecil-sulfato-sódico y urea.

Todas las líneas pertenecen a cepas de *E. coli.*

(A) *Líneas:* **1**, *E. coli* KL16; **2**, *E. coli* JF703; **3**, *E. coli* JF699; **4**, *E. coli* ATCC 25922; **5**, 1P; **6**, 1N; **7**, 1C; **8**, 1L; **9**, 7P; **10**, 7L

(B) *Líneas:* **1**, *E. coli* KL16; **2**, *E. coli* ATCC 25922; **3**, 2P; **4**, 2N; **5**, 2L

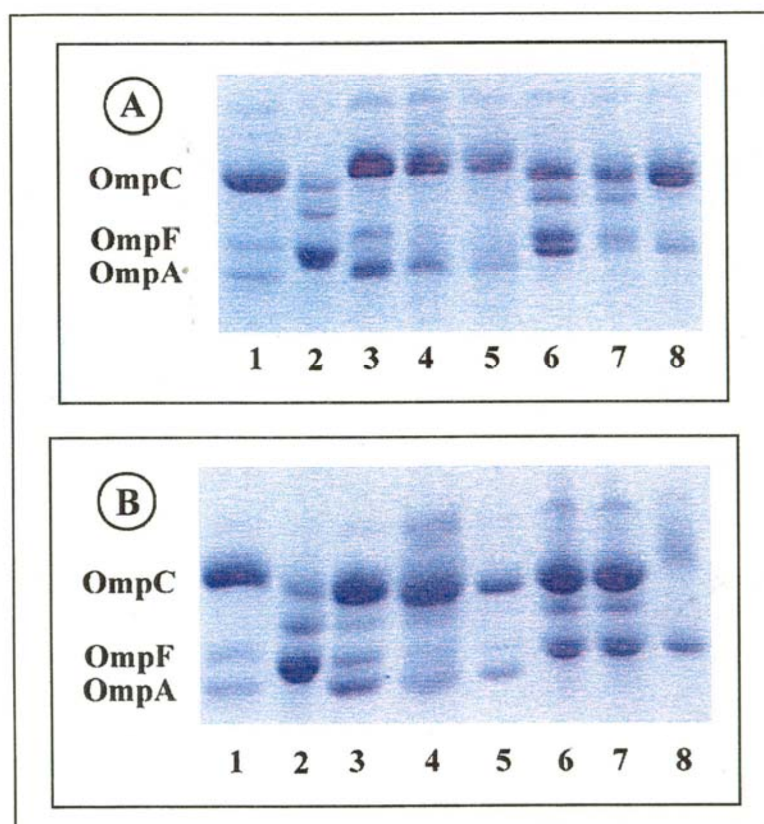


Figura 8.4. Perfiles electroforéticos de los extractos de proteínas de la membrana externa en gel de poliacrilamida al 10% suplementado con dodecil-sulfato-sódico y urea.
Todas las líneas pertenecen a cepas de *E. coli*.
(A) Líneas: **1**, *E. coli* KL16; **2**, *E. coli* ATCC 25922; **3**, 3P; **4**, 3N; **5**, 3L; **6**, 4P; **7**, 4N; **8**, 4L.

(B) Líneas: **1**, *E. coli* KL16; **2**, *E. coli* ATCC 25922; **3**, 5P; **4**, 5N; **5**, 5L; **6**, 9P; **7**, 9N; **8**, 9L.

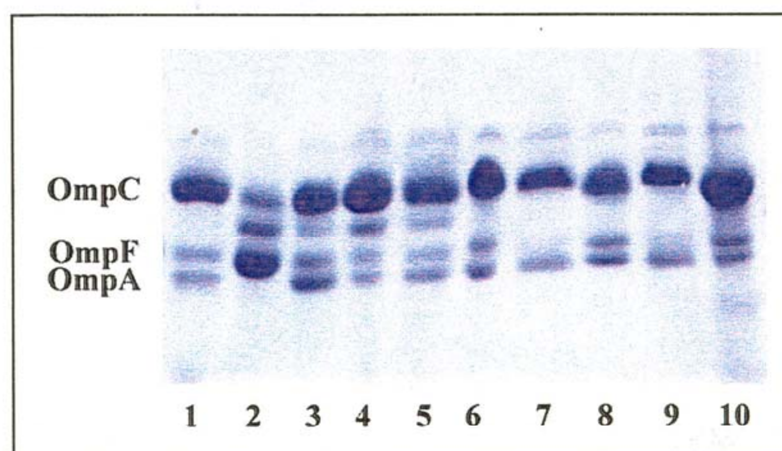


Figura 8.5. Perfiles electroforéticos de los extractos de proteínas de la membrana externa en gel de poliacrilamida al 10% suplementado con dodecil-sulfato-sódico y urea.
Todas las líneas pertenecen a cepas de *E. coli.*

Líneas: **1**, *E. coli* KL16; **2**, *E. coli* ATCC 25922; **3**, 6P; **4**, 6N; **5**, 6L; **6**, 8P; **7**, 8N; **8**, 10P; **9**, 10N; **10**, 10L.

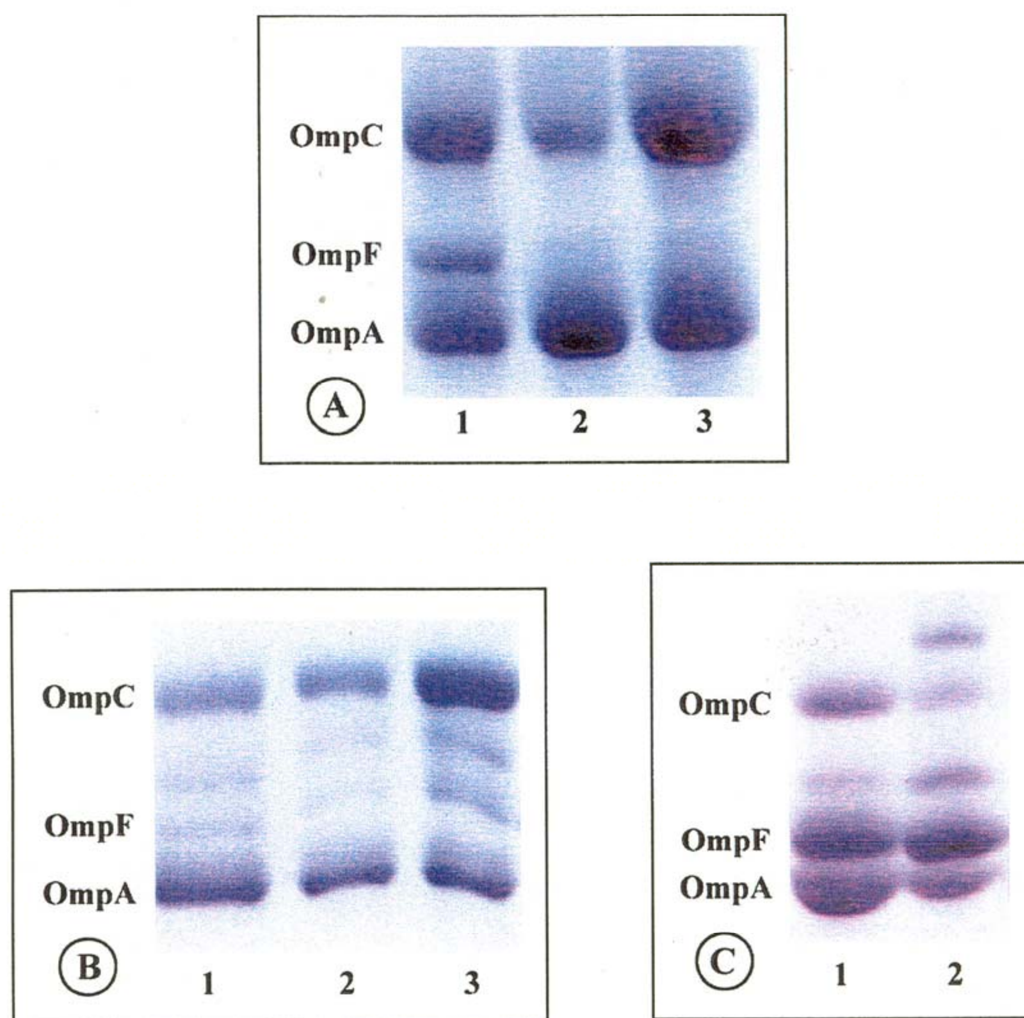


Figura 8.6. Perfiles electroforéticos de los extractos de proteínas de la membrana externa en gel de poliacrilamida al 10% suplementado con dodecil-sulfato-sódico y urea.

Todas las líneas pertenecen a cepas de *E. coli.*
(A) *Líneas:* **1**, 3P; **2**, 3N; **3**, 3L
(B) *Líneas:* **1**, 6P; **2**, 6N; **3**, 6L
(C) *Líneas:* **1**, 7P; **2**, 7L

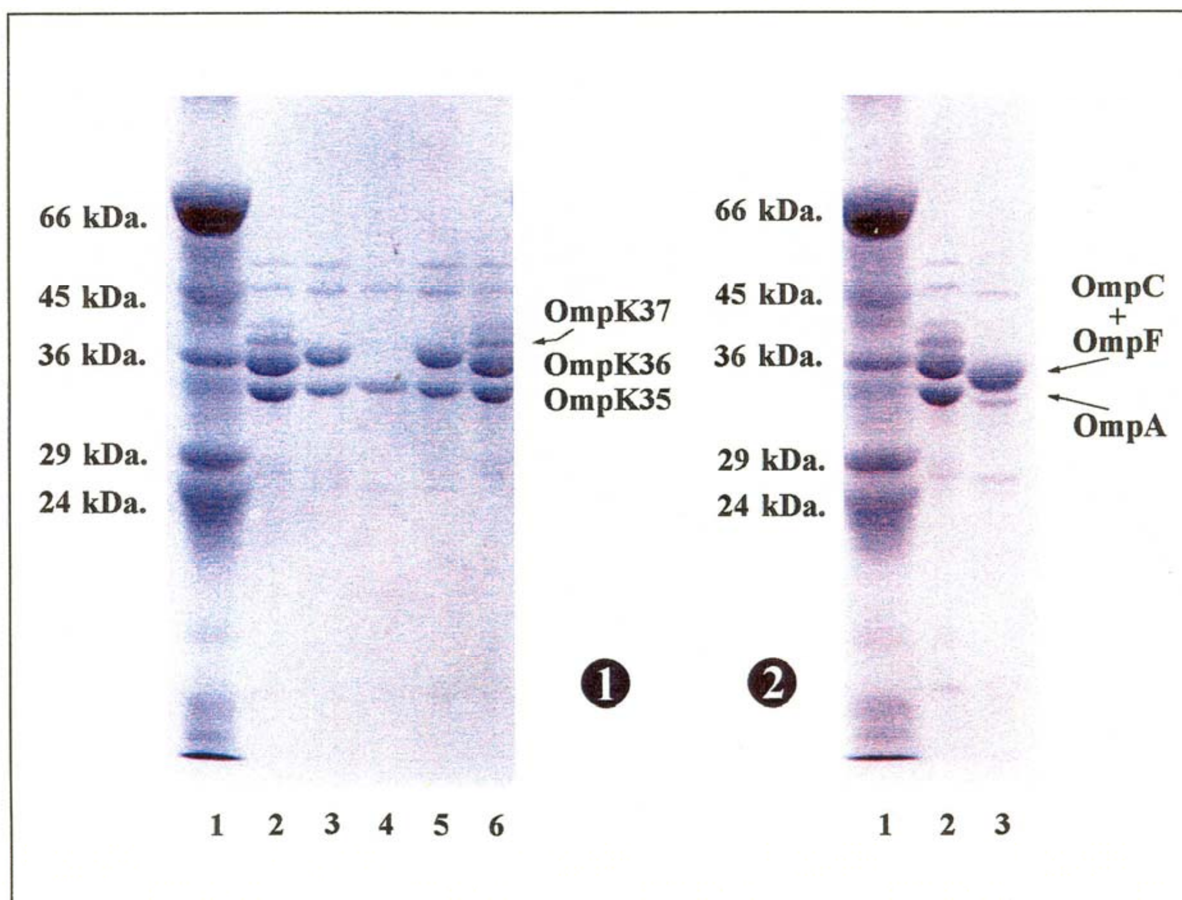


Figura 8.7. Perfiles electroforéticos de los extractos de proteínas de la membrana externa en gel de poliacrilamida al 11%, conteniendo bisacrilamida al 0,55% y dodecil-sulfato-sódico, pero sin urea.

❶ Líneas:

1, Marcador de peso molecular: albúmina bovina (66 kDa), albúmina de huevo (45 kDa), gliceraldehído 3-P-deshidrogenasa de músculo de conejo (36 kDa), anhidrasa carbónica de eritrocitos bovinos (29 kDa), tripsinógeno de páncreas bovino tratado con PMSF (24 kDa)
2, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031
3, *Klebsiella pneumoniae* 16P
4, *Klebsiella pneumoniae* 16N
5, *Klebsiella pneumoniae* 16L
6, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031

❷ Líneas:

1, Marcador de peso molecular como en ❶
2, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031
3, *Escherichia coli* KL16

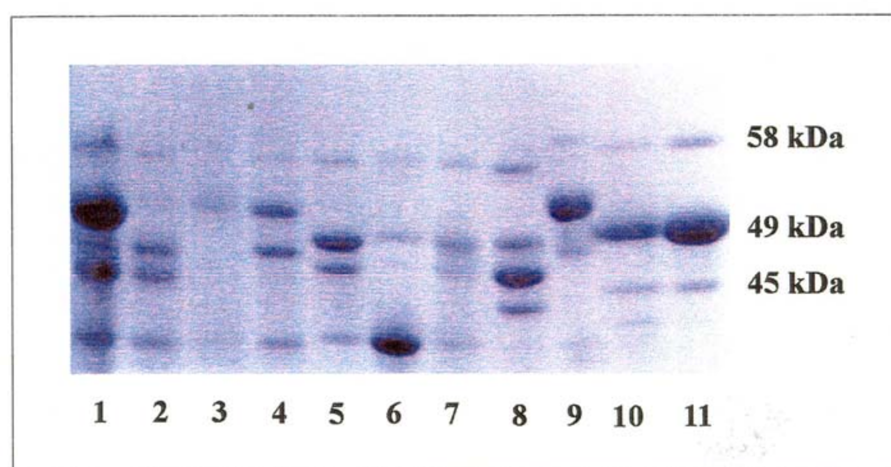


Figura 8.8. Perfiles electroforéticos de los extractos de proteínas de la membrana externa en gel de poliacrilamida al 10% suplementado con dodecil-sulfato-sódico y urea.

Líneas:

1, *Enterobacter cloacae* NCIB 12091 (P99)
2, *Enterobacter cloacae* 14P
3, *Enterobacter cloacae* 14N
4, *Enterobacter cloacae* 14L
5, *Enterobacter cloacae* 15P
6, *Enterobacter cloacae* 15N
7, *Enterobacter cloacae* 15L
8, *Enterobacter cloacae* T ATCC 13047
9, *Enterobacter aerogenes* T DSM 30053
10, *Escherichia coli* KL16
11, *Escherichia coli* JF699

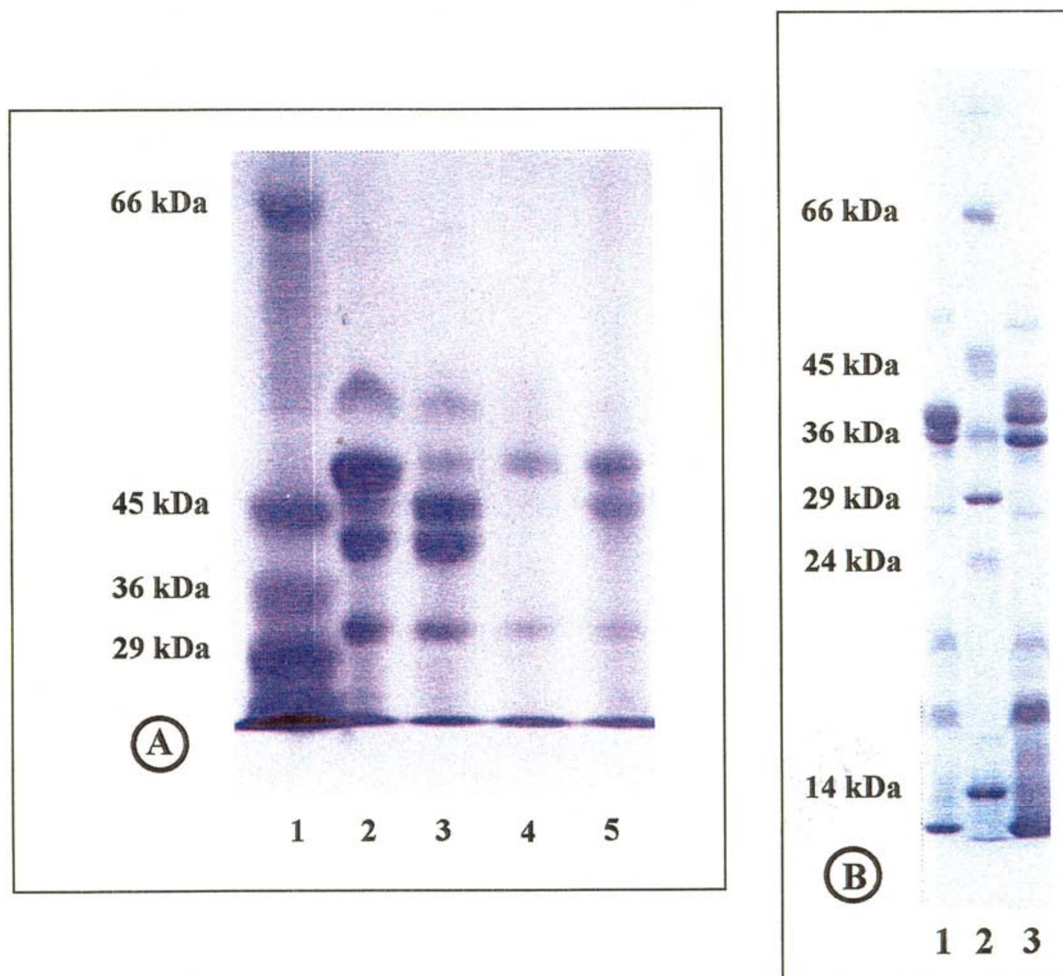


Figura 8.9. Perfiles electroforéticos de los extractos de proteínas de la membrana externa. En (A) gel de poliacrilamida al 10% suplementado con dodecil-sulfato-sódico (SDS) y urea. En (B) al 14%, con SDS y sin urea.

(A) *Líneas:*

1, Marcador de peso molecular: albúmina bovina (66 kDa), albúmina de huevo (45 kDa), gliceraldehído 3-P-deshidrogenasa de músculo de conejo (36 kDa), anhidrasa carbónica de eritrocitos bovinos (29 kDa), tripsinógeno de páncreas bovino tratado con PMSF (24 kDa).

2, *Enterobacter cloacae* NCIB 12091

3, *Enterobacter cloacae* 14P

4, *Enterobacter cloacae* 14N

5, *Enterobacter cloacae* 14L

(B) *Líneas:*

1, *Enterobacter cloacae* 15P

2, Marcador de peso molecular (igual que en A1, más α-lactoalbúmina: 14,2 kDa)

3, *Enterobacter cloacae* 14P

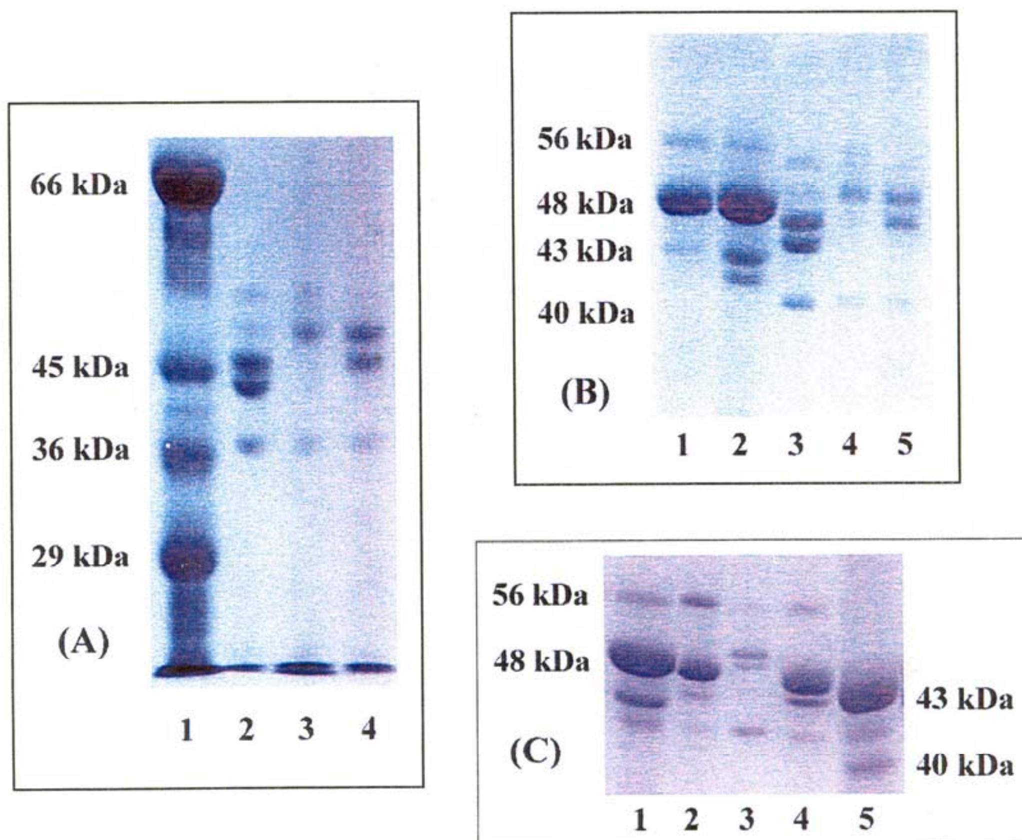


Figura 8.10. Perfiles electroforéticos de los extractos de proteínas de la membrana externa en gel de poliacrilamida al 10% suplementado con dodecil-sulfato-sódico y urea.

(A) Líneas:
1, Marcador de peso molecular: albúmina bovina (66 kDa), albúmina de huevo (45 kDa), gliceraldehído 3-P-deshidrogenasa de músculo de conejo (36 kDa), anhidrasa carbónica de eritrocitos bovinos (29 kDa), tripsinógeno de páncreas bovino tratado con PMSF (24 kDa); **2**, *E. cloacae* 14P; **3**, *E. cloacae* 14N; **4**, *E. cloacae* 14L

(B) Líneas:
1, *E. coli* JF699; **2**, *E. coli* KL16; **3**, *E. cloacae* 14P; **4**, *E. cloacae* 14N; **5**, *E. cloacae* 14L

(C) Líneas:
1, *E. coli* KL16; **2**, *C. diversus* 12P; **3**, *C. diversus* 12N; **4**, *C. diversus* CCUG 14559; **5**, Marcador de peso molecular (como en A-1).

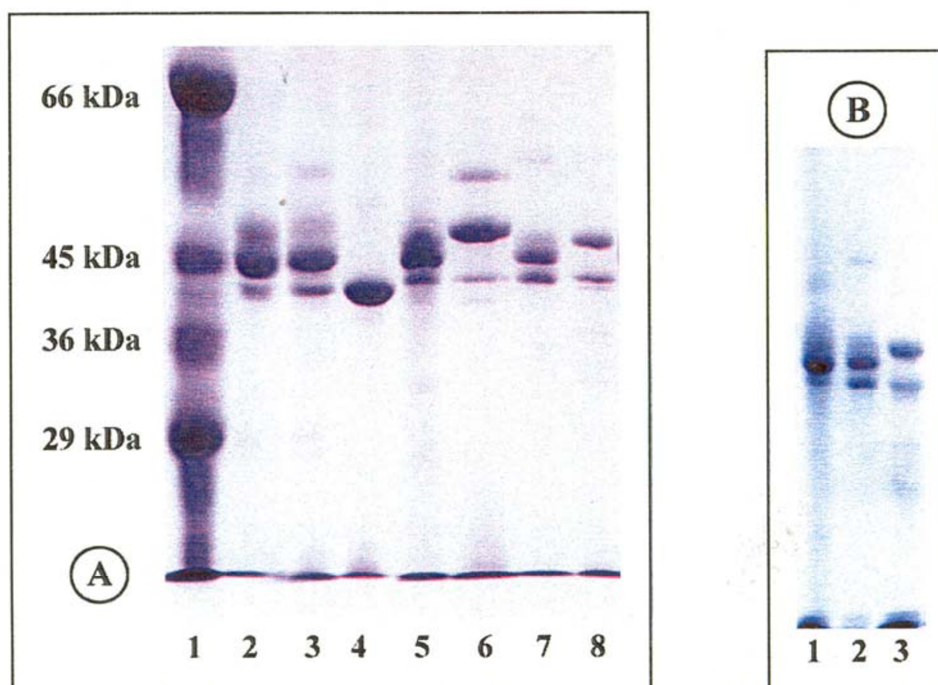


Figura 8.11. Perfiles electroforéticos de los extractos de proteínas de la membrana externa en gel de poliacrilamida al 10% suplementado con dodecil-sulfato-sódico y urea.

(A) Líneas:
1, Marcador de peso molecular: albúmina bovina (66 kDa), albúmina de huevo (45 kDa), gliceraldehído 3-P-deshidrogenasa de músculo de conejo (36 kDa), anhidrasa carbónica de eritrocitos bovinos (29 kDa), tripsinógeno de páncreas bovino tratado con PMSF (24 kDa);
2, *Salmonella enteritidis* 18P
3, *Salmonella enteritidis* 18L
4, *Proteus vulgaris* 17P
5, *Proteus vulgaris* 17L
6, *Escherichia coli* KL16
7, *Citrobacter freundii* 13P
8, *Citrobacter freundii* 13N

(B) Líneas:
1, *Citrobacter freundii* 13L
2, *Citrobacter freundii* 13P
3, *Citrobacter freundii* 13N

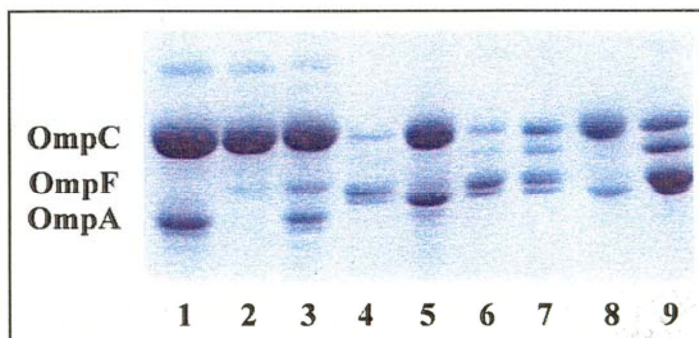


Figura 8.12. Perfiles electroforéticos de los extractos de proteínas de la membrana externa en gel de poliacrilamida al 10% suplementado con dodecil-sulfato-sódico y urea.

<u>*Líneas:*</u>
1, *Escherichia coli* JF703
2, *Escherichia coli* JF699
3, *Escherichia coli* KL16
4, *Escherichia coli* 11P
5, *Escherichia coli* 11C
6, *Escherichia coli* 7P
7, *Escherichia coli* 7L
8, *Escherichia coli* 7C
9, *Escherichia coli* ATCC 25922

2.- EXPRESIÓN DE LA PORINA F (OMPF) EN CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI*

Es conocido que, en *Escherichia coli*, la disminución cuantitativa de la porinas, y sobre todo de la porina F, conlleva un aumento de la resistencia a los β-lactámicos por impermeabilidad de la membrana externa debido a que éstas pasan preferentemente por la OmpF. Este canal de paso a través de la membrana es también compartido por las quinolonas.

A partir de los datos obtenidos de las densitometrías de los perfiles electroforéticos de los extractos de proteínas de membrana se ha elaborado la tabla 67, donde se puede observar que para algunas cepas la desaparición de dicha proteína ha sido total.

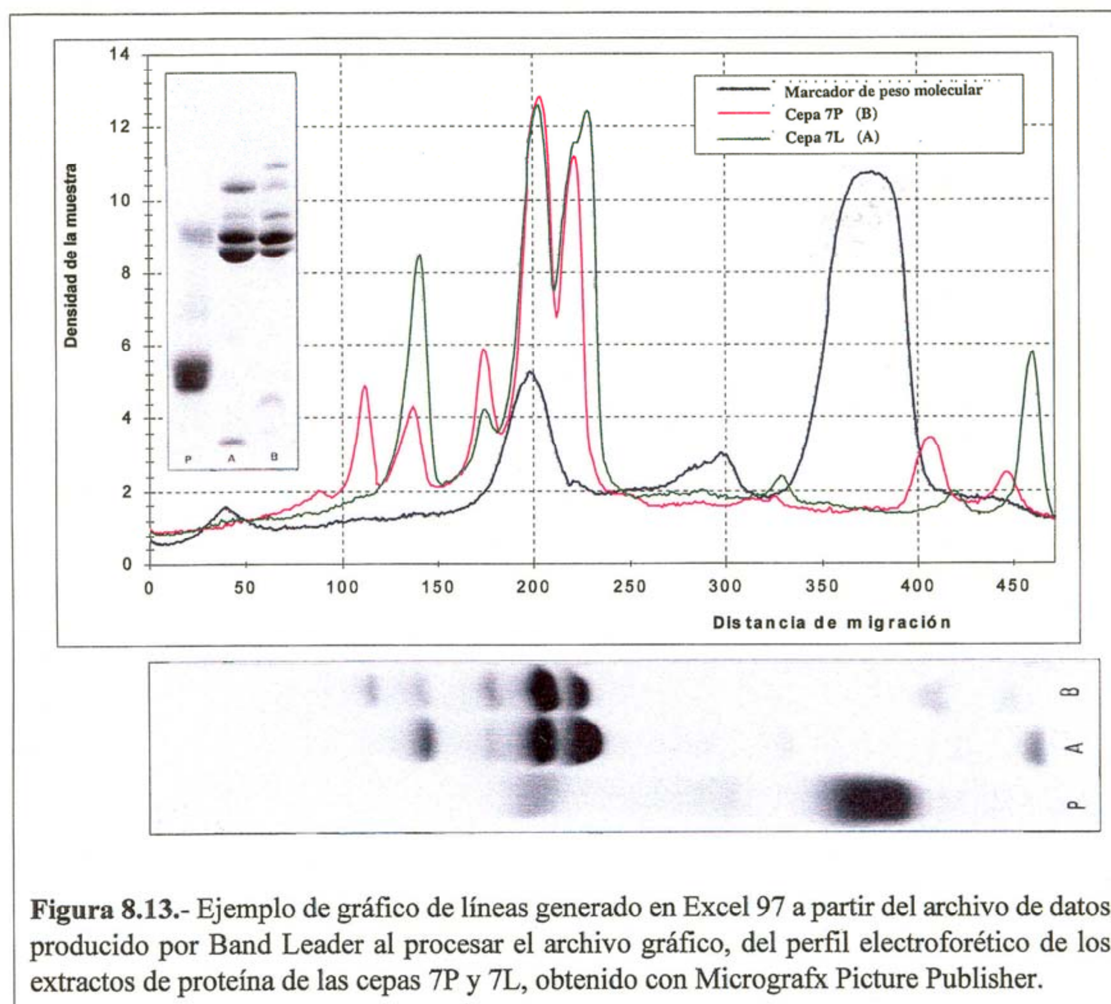


Figura 8.13.- Ejemplo de gráfico de líneas generado en Excel 97 a partir del archivo de datos producido por Band Leader al procesar el archivo gráfico, del perfil electroforético de los extractos de proteína de las cepas 7P y 7L, obtenido con Micrografx Picture Publisher.

También se ha elaborado un pequeño estudio de correlación entre la expresión de la porina OmpF y la susceptibilidad a determinados antimicrobianos. Los datos finales del test de correlación de Spearman se exponen en la tabla 68. Como se puede comprobar existe una alta correlación entre la expresión de la porina OmpF y la CMI de algunos β-lactámicos ensayados, es decir a menor expresión de la OmpF mayor será la CMI presentada, o lo que es lo mismo, menor susceptibilidad presentará la cepa frente a dicho antimicrobiano. De igual modo se puede observar una correlación media entre la expresión de la OmpF y el nivel de susceptibilidad a quinolonas.

TABLA 67.- PORCENTAJE DE EXPRESIÓN DE LA PORINA F (OMPF) [a]

Cepas	% OmpF	Cepas	% OmpF	Cepas	% OmpF	Cepas	% OmpF
1P	100	3P	100	6P	100	9P	100
1N	0	3N	9	6N	69	9N	84
1L	90	3L	10	6L	64	9L	8
1C	5						
		4P	100	7P	100	10P	100
2P	100	4N	40	7L	95	10N	10
2N	0	4L	0	7C	0	10L	100
2L	0						
		5P	100	8P	100	11P	100
		5N	58	8N	0	11C	0
		5L	12				

[a] % OmpF = Porcentaje del valor densitométrico de la expresión de la OmpF. Este valor de la OmpF en las cepas origen se toma como 100%.

TABLA 68.- CORRELACIÓN DE SPEARMAN ENTRE EL NIVEL DE EXPRESIÓN DE LA PORINA F (OMPF) Y LA CMI DE DIVERSOS ANTIMICROBIANOS

Antimicrob	Spearman		Antimicrob	Spearman		Antimicrob	Spearman
NAL	– 0,63		FOX	– 0,77		TM	0,29
NOR	– 0,59		ZOX	– 0,73		AMK	0,12
LMF	– 0,61		CAZ	– 0,84		TC	– 0,05
TMF	– 0,52		CTX	– 0,74		ACR	– 0,33
CIP	– 0,52		CRO	– 0,36		BE	– 0,42
OFX	– 0,55		IMP	0,17		NOV	– 0,42
SPX	– 0,54		MRP	– 0,53		MTC	– 0,41
CLT	– 0,33		GM	0,26		CCCP	– 0,35

NAL, Ácido nalidíxico; NOR, Norfloxacina; LMF, Lomefloxacina; TMF, Temafloxacina; CIP, Ciprofloxacina; OFX, Ofloxacina; SPX, Esparfloxacina
CLT, Cefalotina; FOX, Cefoxitina; ZOX, Ceftizoxima; CAZ, Ceftazidima
CTX, Cefotaxima; CRO, Ceftriaxona; IMP, Imipenem; MRP, Meropenem
GM, Gentamicina; TM, Tobramicina; AMK, Amikacina; TC, Tetraciclina;
ACR, Acriflavina; BE, Bromuro de Etidio; NOV, Novobiocina; MTC, Mitomicina-C;
CCCP, Carbonil cianuro *m*-clorofenilhidrazona.

9 RESULTADOS: ELECTROFORESIS DE LIPOPOLISACÁRIDOS

1 - **Cambios observados en el LPS de la membrana externa de las cepas de *Escherichia coli.***

2 - **Cambios observados en el LPS de la membrana externa de otras cepas de Enterobacterias.**

3 - **Ventajas del uso del 0,5% de SDS en los geles de poliacrilamida para la separación del LPS de las enterobacterias.**

Los lipopolisacáridos (LPS) son moléculas complejas, situadas en la hoja externa de la membrana externa de casi todas las bacterias gramnegativas. Los LPS tienen unos pesos moleculares superiores a 10 kDa, varían en su composición química e intervienen en la configuración de la membrana externa.
El interés por la separación electroforética de los componentes del LPS se debió a los trabajos de investigación previos de otros autores que han descrito la asociación de cambios en la expresión del lipopolisacárido de la membrana externa con el desarrollo de resistencia a quinolonas en bacterias gramnegativas [135, 204, 414]. Se ha propuesto que en el fenotipo liso (alta expresión del antígeno O) estaría aumentada la hidrofilicidad de la membrana externa bacteriana, dificultando la penetración de quinolonas [135, 204, 326]. Por el contrario, una pérdida de expresión del antígeno O, y por tanto un fenotipo rugoso, contribuiría a la mejor penetración de la molécula de ácido nalidíxico o, en cualquier caso, no disminuiría su acumulación en la célula bacteriana de *E. coli.*

El estudio de los perfiles electroforéticos de los extractos de LPS de la membrana externa, tanto de las cepas origen como mutantes, se exponen en las figuras 9.1 a 9.6 siguientes.

9.1 - CAMBIOS OBSERVADOS EN EL LPS DE LA MEMBRANA EXTERNA DE LAS CEPAS DE *E. COLI*

El lipopolisacárido de todas las cepas origen estudiadas y los mutantes desarrollados a partir de ellas mostraron un fenotipo liso en

su lipopolisacárido de membrana externa, con la excepción de:

1- Las cepas 5P y 5N mostraron el fenotipo rugoso mientras la cepa 5L mostró fenotipo liso (figuras 9.3.2 y 9.6).
2- La cepa 6P mostró fenotipo rugoso mientras los mutantes desarrollados a partir de ella (cepas 6N y 6L) presentaron fenotipo liso (figuras 9.1, 9.2 y 9.3.A).
3- La cepa 10P mostró fenotipo liso mientras que el mutante 10N mostró fenotipo rugoso (figura 9.1, 9.2 y 9.3.A).
4- La cepa 8P mostró fenotipo rugoso mientras que el mutante 8N mostró fenotipo liso (figura 9.4).

9.2 - CAMBIOS OBSERVADOS EN EL LPS DE LA MEMBRANA EXTERNA DE OTRAS CEPAS DE ENTEROBACTERIAS:

El lipopolisacárido de todas las cepas origen de otras enterobacterias estudiadas y los mutantes desarrollados a partir de ellas mostraron un fenotipo liso en su lipopolisacárido de membrana externa, con la excepción de las cepas de *Salmonella enteritidis* (18P y 18L), *Citrobacter freundii* (13P, 13N y 13L) y las cepas mutantes de *Enterobacter cloacae* 14L y15N (figura 9.5.A) que presentaron un fenotipo rugoso, el cual se ha identificado con la falta de expresión de componentes de alto peso molecular en geles de poliacrilamida.

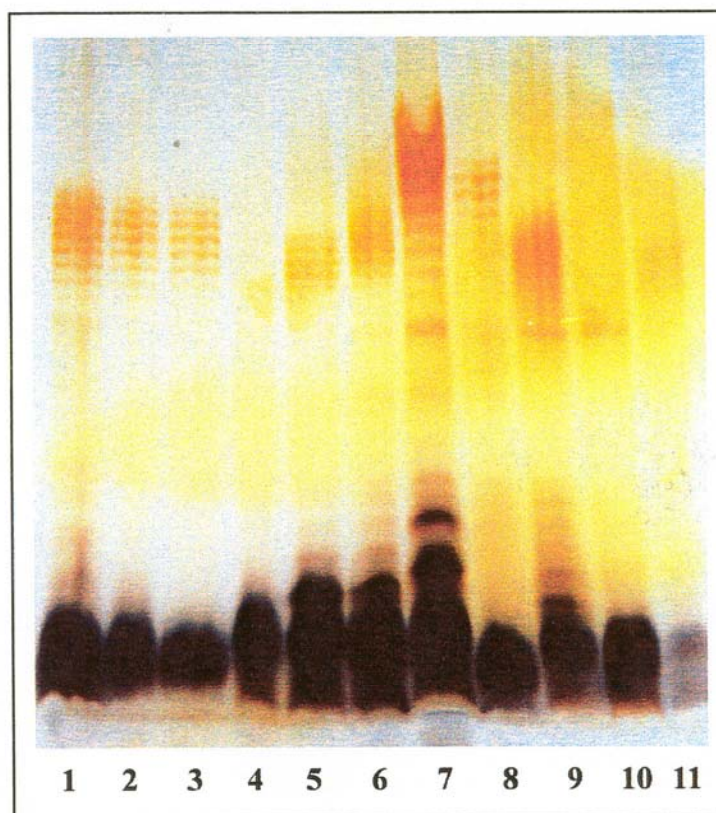


Figura 9.1. Perfiles electroforéticos de los extractos del lipopolisacárido de la membrana externa en gel de poliacrilamida al 15% y 0,5% de dodecil sulfato sódico (SDS).

Todas las líneas pertenecen a *E. coli.*

Líneas:

1, 1P; **2**, 1N; **3**, 1L, **4**, 6P; **5**, 6N, **6**, 6L
7, 7P; **8**, 7L; **9**, 10P; **10**, 10N, **11**, 10L

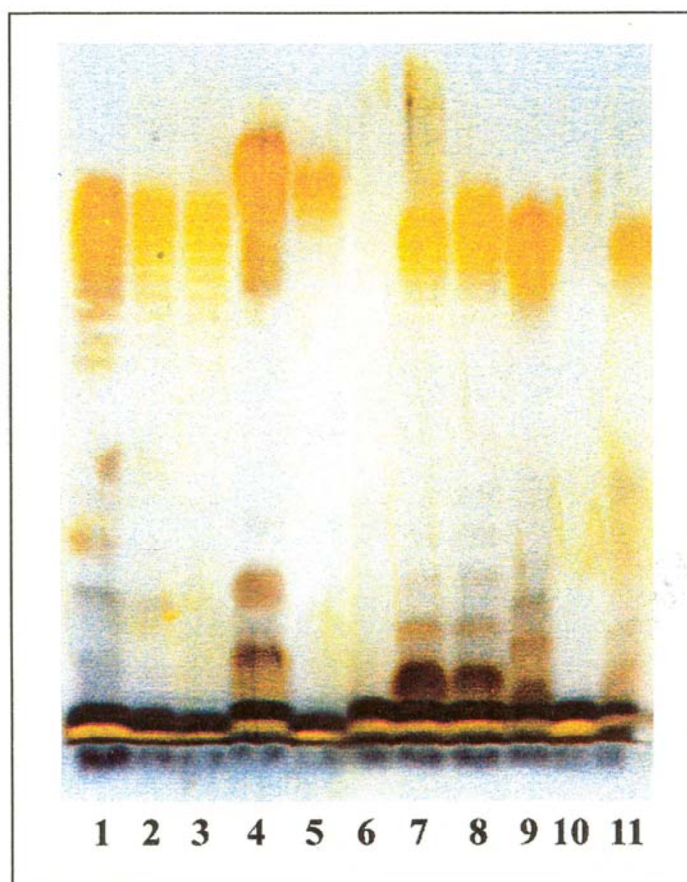


Figura 9.2. Perfiles electroforéticos de los extractos del lipopolisacárido de la membrana externa en gel de poliacrilamida al 13,5% y 20 mM de EDTA.

Todas las líneas pertenecen a *E. coli.*
Líneas:
1, 1P; **2**, 1N; **3**, 1L, **4**, 7P; **5**, 7L; **6**, 6P
7, 6N; **8**, 6L; **9**, 10P; **10**, 10N; **11**, 10L

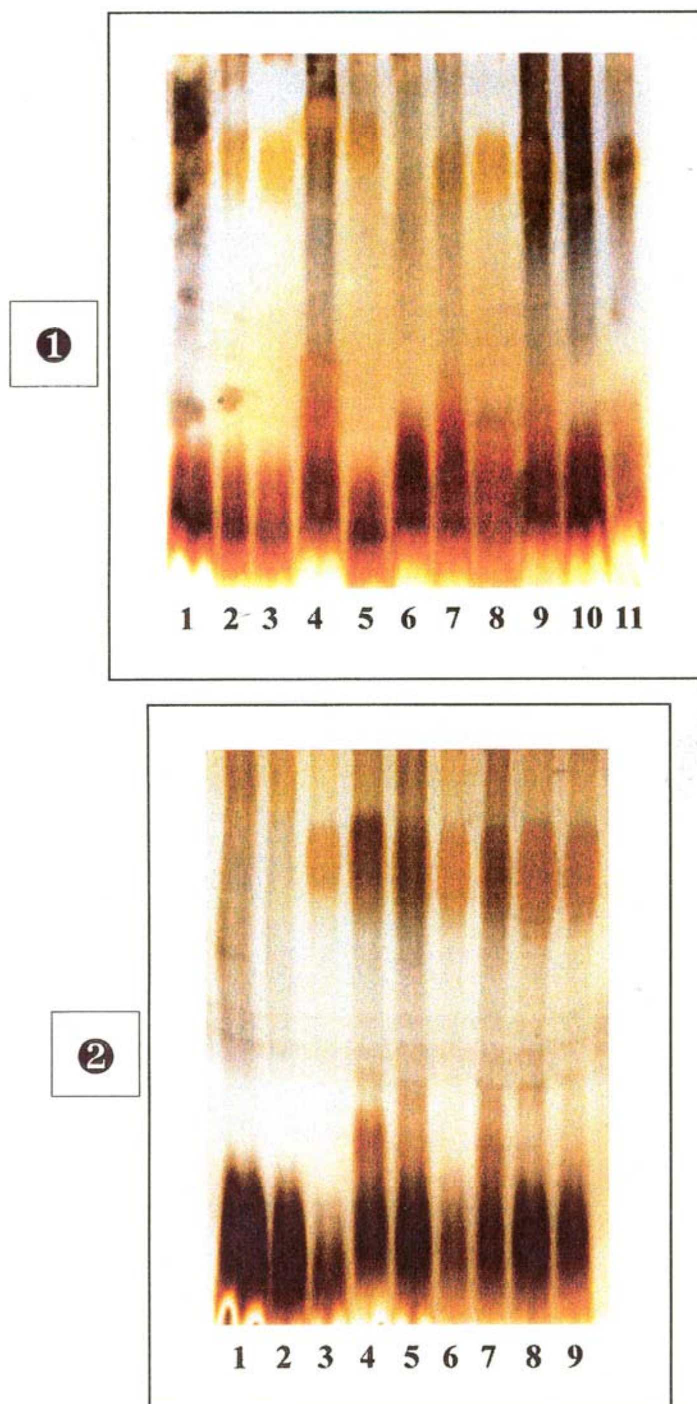


Figura 9.3. Perfiles electroforéticos de los extractos del lipopolisacárido de la membrana externa en gel de poliacrilamida al 13,5%. Todas las líneas pertenecen a *E. coli*.

❶ Líneas: **1**, 1P; **2**, 1N; **3**, 1L, **4**, 7P; **5**, 7L **6**, 6P; **7**, 6N; **8**, 6L; **9**, 10P; **10**, 10N; **11**, 10L

❷ Líneas: **1**, 5P; **2**, 5N; **3**, 5L, **4**, 9P; **5**, 9N **6**, 9L; **7**, 4P; **8**, 4N; **9**, 4L

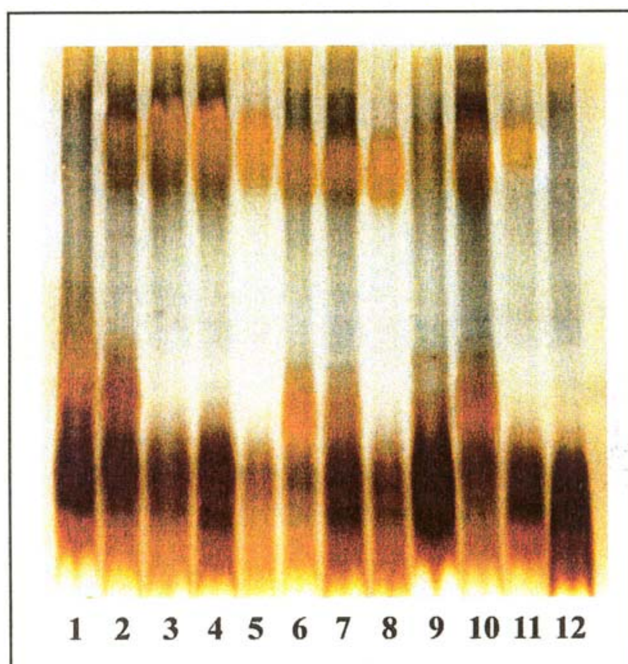


Figura 9.4. Perfiles electroforéticos de los extractos del lipopolisacárido de la membrana externa en gel de poliacrilamida al 13,5%. Todas las líneas pertenecen a *E. coli*.

Líneas:
1, 8P; **2**, 8N; **3**, 2P; **4**, 2N; **5**, 2L
6, 3P; **7**, 3N; **8**, 3L; **9**, 1P; **10**, 3P
11, 7C; **12**, 11C

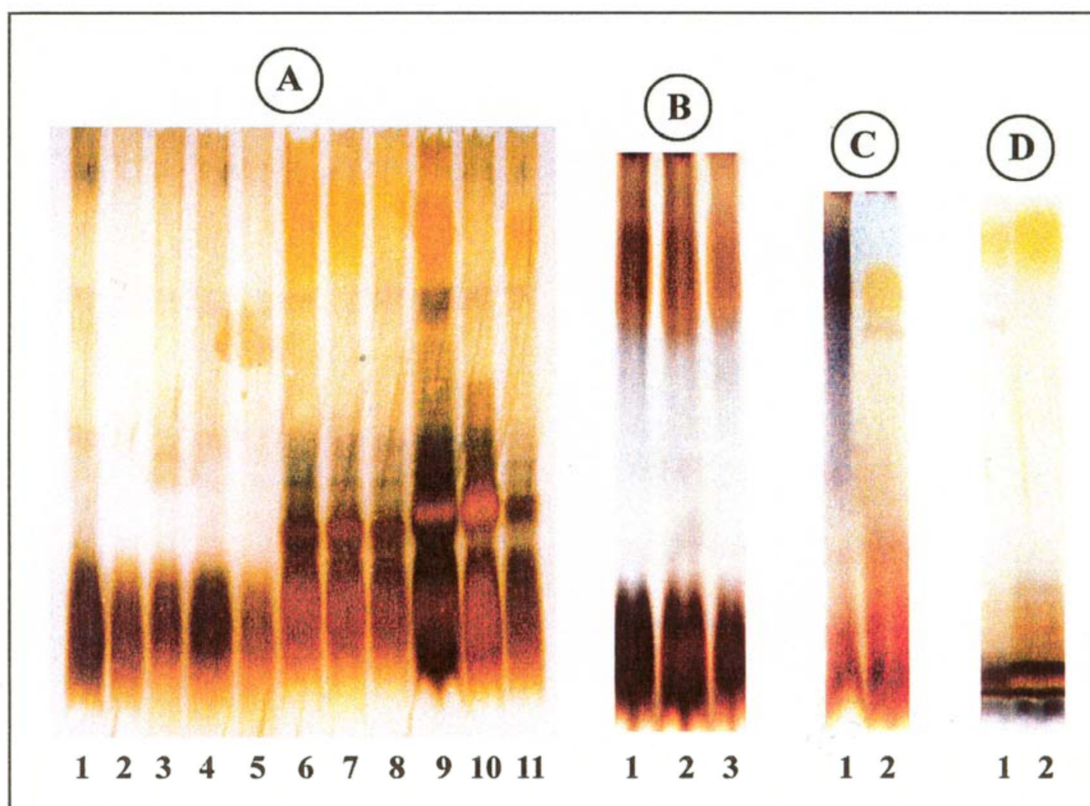


Figura 9.5. Perfiles electroforéticos de los extractos del lipopolisacárido de la membrana externa en gel de poliacrilamida al 13,5% (A), (B) y (C), y en gel de poliacrilamida al 13,5% con 20 mM de EDTA (D).

(A) Líneas:
- **1**, *Salmonella enteritidis* 18P
- **2**, *Salmonella enteritidis* 18L
- **3**, *Citrobacter freundii* 13P
- **4**, *Citrobacter freundii* 13N
- **5**, *Citrobacter freundii* 13L
- **6**, *Enterobacter cloacae* 14P
- **7**, *Enterobacter cloacae* 14N
- **8**, *Enterobacter cloacae* 14L
- **9**, *Enterobacter cloacae* 15P
- **10**, *Enterobacter cloacae* 15N
- **11**, *Enterobacter cloacae* 15L

(B) Líneas:
- **1**, *Klebsiella pneumoniae* 16P
- **2**, *Klebsiella pneumoniae* 16N
- **3**, *Klebsiella pneumoniae* 16L

(C) Líneas:
- **1**, *Citrobacter diversus* 12P
- **2**, *Citrobacter diversus* 12N

(D) Líneas:
- **1**, *Citrobacter diversus* 12P
- **2**, *Citrobacter diversus* 12N

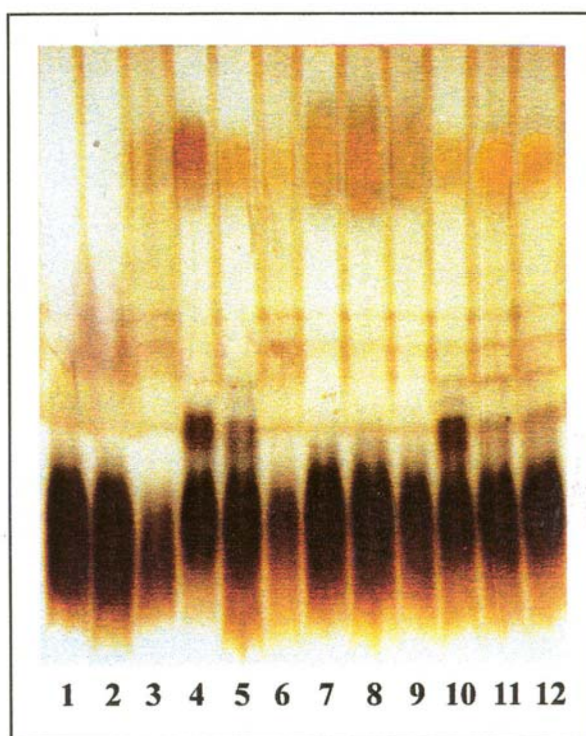


Figura 9.6. Perfiles electroforéticos de los extractos del lipopolisacárido de la membrana externa en gel de poliacrilamida al 13,5%
Las líneas 1 a 6 y 10 a 12 pertenecen a *E. coli*.
Las líneas 7 a 9 pertenecen a *Klebsiella pneumoniae*.

Líneas:

1, 5P; **2**, 5N; **3**, 5L
4, 9P; **5**, 9N; **6**, 9L
7, 16P; **8**, 16N; **9**, 16L
10, 4P; **11**, 4N; **12**, 4L

9.3 - VENTAJAS DEL USO DEL 0,5% DE SDS EN LOS GELES DE POLIACRILAMIDA PARA LA SEPARACIÓN DEL LPS DE ENTEROBACTERIAS

La frecuente agregación de los polímeros en los extractos de LPS, tanto de alto como de bajo peso molecular, hace difícil la caracterización de posibles cambios en ellos. En trabajos previos de otros autores se ha observado que mínimas cantidades del LPS de *E. coli* (del orden de nanogramos) parecen formar multímeros, no asociados covalentemente, en un geles que contengan un 0,1% de SDS o menos. Estos multímeros emigran más despacio que sus sustituyentes monoméricos, causando bandas anómalas que aparecen o se solapan con las bandas del monómero del antígeno O. Por lo tanto, en extractos de LPS sin fraccionar, una mejor disociación del LPS aportará una mejor resolución de las bandas del monómero de LPS (un patrón de bandas escalonado) haciendo más fácil la caracterización de LPS por SDS-PAGE y tinción de plata. Los resultados del estudio realizado del LPS de *E. coli* en geles de poliacrilamida con diferentes concentraciones de SDS demostraron que el uso del 0,5% de SDS permitió una mejor separación de los monómeros de muestras del LPS de cepas de *E. coli*, tal como puede apreciarse en la figura 9.1, permitiéndonos una mejor caracterización de los cambios del LPS que se asociaron al desarrollo de resistencia a quinolonas. Por otro lado, el EDTA también se ha descrito como un agente que puede disminuir la agregación del LPS aunque en este estudio el uso de EDTA no resultó en un claro patrón de bandas escalonado aunque hubo menos agregación de los polímeros de LPS de bajo peso molecular (core completo y moléculas del lípido A) que con el 0,5% de SDS, como puede apreciarse en las figuras 9.2 y 9.5 (D).

10 RESULTADOS: ENSAYOS DE ACUMULACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE TOPOISOMERASAS

1.- Ensayos de acumulación en *Escherichia coli* y otras enterobacterias.

2.- Detección de mutaciones en la ADN-girasa y topoisomerasa IV en las cepas de *Escherichia coli*.

10.1 - ENSAYOS DE ACUMULACIÓN EN *ESCHERICHIA COLI* Y OTRAS ENTEROBACTERIAS

Estudios sobre permeabilidad y papel del transporte transmembrana protón dependiente

Si el sistema de transporte transmembrana o expulsión activa requiere una energía que es suministrada por un gradiente electroquímico de protones, como por ejemplo la fuerza motriz protónica (PMF) con que funcionan la mayor parte de los sistemas de expulsión activa, podría ser inhibido por sustancias que bloquean dicho transporte electrónico como el cianuro o por agentes que despolarizan la membrana externa, destruyendo el gradiente electroquímico de protones, como el 2,4-dinitrofenol (DNP) o el carbonil-cianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP). Este último destruye el gradiente de pH favoreciendo la acumulación de las fluoroquinolonas.

El aumento del transporte transmembrana protón-dependiente en mutantes resistentes a quinolonas es una causa importante de resistencia, debido a que impide al aumento de la acumulación de la droga.

En las siguientes tablas se presentan los datos de acumulación obtenidos en las cepas origen y mutantes de *Escherichia coli* (tablas 69 a 72) y otras enterobacterias (tablas 73 y 74).

TABLA 69.- CONCENTRACIONES DE NORFLOXACINA ACUMULADA POR LA CEPAS ORIGEN Y SELECCIONADAS CON NOR, LMF Y CAZ EN *E. COLI*

Cepas [b]	[NOR] Acumulado (µg/g peso seco) [a]					% NOR Acumulado
	Minutos			Medias		
	5'	15'	30'	$\bar{x}$ [c]	σ [d]	
KL16 –	211	211	211	211	0	1,6
KL16 +	211	211	211	211	1	1,6
JF703 –	130	150	150	143	1	1,1
JF703+	130	150	150	143	2	1,1
1 P –	70	73	79	74	3	0,6
1 P +	95	103	101	99	4	0,8
1 P #	108	108	107	108	0	0,8
1 N –	57	59	54	56	1	0,4
1 N +	122	135	108	122	3	0,9
1 N #	126	137	137	131	3	1,0
1 L –	66	77	78	74	1	0,6
1 L +	151	127	127	135	3	1,0
1 L #	159	159	160	159	0	1,2
2 P –	87	102	99	95	0	0,7
2 P +	94	80	87	87	4	0,7
2 P #	88	105	104	99	2	0,6
2 N –	29	31	30	30	0	0,2
2 N +	90	87	87	59	2	0,5
2 N #	84	87	90	71	0	0,5
2 L –	55	64	64	59	0	0,5
2 L +	131	125	126	126	4	1,0
2 L #	103	97	107	100	4	0,8

[a] Tomando el valor de 0,76 mg como el peso seco de 1 ml de suspensión bacteriana de DO=1,5

[b] **P**: Cepa Origen; **N**: Seleccionada a Norfloxacina; **L**: Seleccionado a Lomefloxacina, **C**: Seleccionado a Ceftazidima.
–: Sin CCCP; +: con 50 µM de CCCP; #: con 100 µM de CCCP.

[c] Media de los valores obtenidos a los 5, 15 y 30 minutos del ensayo.

[d] Media de las desviaciones estándar observadas a los 5, 15 y 30 minutos.

TABLA 70.- CONCENTRACIONES DE NORFLOXACINA ACUMULADA POR LA CEPAS ORIGEN Y SELECCIONADAS CON NOR, LMF Y CAZ EN *E. COLI*

Cepas	[NOR] Acumulado (µg/g peso seco)					% NOR Acumulado
	Minutos			Medias		
	5'	15'	30'	$\bar{x}$	σ	
3 P –	23	25	25	24	1	0,2
3 P +	23	27	27	25	0	0,2
3 P #	24	28	28	26	1	0,2
3 N –	26	24	25	25	1	0,2
3 N +	22	27	27	25	0	0,2
3 N #	21	27	27	24	0	0,2
3 L –	20	25	24	22	0	0,2
3 L +	26	30	29	29	0	0,2
3 L #	26	27	27	27	0	0,2
4 P –	22	25	26	24	0	0,2
4 P +	20	29	28	26	0	0,2
4 P #	22	30	30	27	1	0,2
4 N –	32	42	39	38	1	0,3
4 N +	29	32	32	31	1	0,2
4 N #	27	40	38	35	0	0,3
4 L –	10	14	15	13	0	0,1
4 L +	27	39	39	35	0	0,3
4 L #	26	40	39	35	2	0,3
5 P –	142	150	147	146	4	1,1
5 P +	153	199	199	184	4	1,4
5 P #	190	203	206	200	0	1,5
5 N –	35	40	40	38	0	0,3
5 N +	217	238	240	232	4	1,8
5 N #	199	224	224	216	4	1,6
5 L –	22	25	25	24	1	0,2
5 L +	79	91	91	87	0	0,7
5 L #	80	88	93	87	1	0,7

TABLA 71.- CONCENTRACIONES DE NORFLOXACINA ACUMULADA POR LA CEPAS ORIGEN Y SELECCIONADAS CON NOR, LMF Y CAZ EN *E. COLI*

Cepas	[NOR] Acumulado (µg/g peso seco)					% NOR Acumulado
	Minutos			Medias		
	5'	15'	30'	x̄	σ	
6 P –	126	151	151	143	2	1,2
6 P +	190	213	213	205	4	1,6
6 P #	186	190	192	189	4	1,3
6 N –	90	110	110	103	3	0,8
6 N +	190	210	210	203	0	1,5
6 N #	175	171	176	174	4	1,3
6 L –	65	76	76	72	3	0,5
6 L +	161	190	190	180	0	1,3
6 L #	98	159	166	141	4	1,0
7 P –	156	156	161	158	2	1,2
7 P +	188	213	213	205	3	1,7
7 P #	159	181	179	173	4	1,3
7 L –	183	203	211	199	2	1,5
7 L +	223	223	311	253	0	1,9
7 L #	223	223	252	233	1	1,9
8 P –	37	37	45	39	0	0,3
8 P +	51	51	55	53	0	0,4
8 P #	54	65	60	60	4	0,5
8 N –	29	31	31	30	1	0,2
8 N +	178	178	178	178	0	1,4
8 N #	178	178	178	178	0	1,4

TABLA 72.- CONCENTRACIONES DE NORFLOXACINA ACUMULADA POR LA CEPAS ORIGEN Y SELECCIONADAS CON NOR, LMF Y CAZ EN *E. COLI*

Cepas	[NOR] Acumulado (µg/g peso seco)					% NOR Acumulado
	Minutos			Medias		
	5'	15'	30'	$\bar{x}$	σ	
9 P –	80	88	88	85	0	0,7
9 P +	108	108	108	108	0	0,8
9 P #	108	108	108	108	0	0,8
9 N –	20	22	21	21	1	0,2
9 N +	40	40	40	40	0	0,3
9 N #	40	40	40	40	0	0,3
9 L –	27	27	27	27	0	0,2
9 L +	92	92	92	92	0	0,7
9 L #	64	82	87	77	1	0,6
10 P –	70	84	110	88	3	0,7
10 P +	170	170	173	171	3	1,3
10 P #	198	185	190	191	5	1,5
10 N –	72	86	98	85	1	0,6
10 N +	171	213	206	197	4	1,5
10 N #	213	213	213	213	4	1,6
10 L –	70	82	92	82	2	0,6
10 L +	128	131	132	130	5	0,9
10 L #	133	127	131	130	4	1,0

TABLA 73.- CONCENTRACIONES DE NORFLOXACINA ACUMULADA POR LA CEPAS ORIGEN Y SELECCIONADAS CON NOR Y LMF EN LAS ENTEROBACTERIAS NO *E. COLI*

Cepas [b]	[NOR] Acumulado (µg/g peso seco) [a]				% NOR Acumulado
	Minutos		Medias		
	5'	15'	x̄ [c]	σ [d]	
12 P –	22	23	22	0	0,2
12 P +	28	34	31	1	0,2
12 P #	29	34	32	0	0,2
12 N –	17	18	18	0	0,2
12 N +	23	23	23	0	0,2
12 N #	17	23	20	1	0,2
13 P –	17	24	21	0	0,2
13 P +	26	30	28	0	0,2
13 P #	27	32	30	0	0,2
13 N –	10	12	11	1	0,1
13 N +	35	40	38	2	0,3
13 N #	39	36	38	0	0,3
13 L –	13	18	16	1	0,1
13 L +	32	30	31	1	0,2
13 L #	29	29	29	0	0,2
14 P –	22	22	22	0	0,2
14 P +	23	27	25	0	0,2
14 P #	24	27	26	0	0,2
14 N –	7	7	7	0	0,1
14 N +	39	42	40	0	0,3
14 N #	39	39	39	0	0,3
14 L –	10	11	11	0	0,1
14 L +	75	79	77	2	0,4
14 L #	80	80	80	0	0,4

[a] Tomando el valor de 0,76 mg como el peso seco de 1 ml de suspensión bacteriana de DO=1,5
[b] **P**: Cepa Origen; **N**: Seleccionada a Norfloxacina; **L**: Seleccionado a Lomefloxacina.
–: Sin CCCP; +: con 50 µM de CCCP; #: con 100 µM de CCCP.
[c] Media de los valores obtenidos a los 5 y 15 minutos del ensayo.
[d] Media de las desviaciones estándar observadas a los 5 y 15 minutos.

TABLA 74.- CONCENTRACIONES DE NORFLOXACINA ACUMULADA POR LA CEPAS ORIGEN Y SELECCIONADAS CON NOR Y LMF EN LAS ENTEROBACTERIAS NO *E. COLI*

Cepas	[NOR] Acumulado (µg/g peso seco)				% NOR Acumulado
	Minutos		Medias		
	5'	15'	$\bar{x}$	σ	
15 P –	27	32	30	1	0,3
15 P +	32	36	34	0	0,3
15 P #	39	38	38	1	0,3
15 N –	12	14	13	1	0,1
15 N +	65	70	68	1	0,7
15 N #	67	67	67	0	0,7
15 L –	15	16	16	0	0,1
15 L +	39	39	39	0	0,3
15 L #	39	39	39	0	0,3
16 P –	52	52	52	0	0,4
16 P +	52	52	52	0	0,4
16 P #	76	67	72	2	0,6
16 N –	10	12	11	0	0,1
16 N +	31	36	34	0	0,3
16 N #	29	36	33	0	0,3
16 L –	22	27	24	0	0,2
16 L +	64	70	67	0	0,5
16 L #	77	74	76	2	0,6
17 P –	17	17	17	0	0,1
17 P +	28	29	28	0	0,2
17 P #	33	31	32	1	0,2
17 L –	17	19	18	0	0,1
17 L +	26	26	26	0	0,2
17 L #	22	22	22	0	0,2
18 P –	19	19	19	0	0,1
18 P +	32	34	33	0	0,3
18 P #	32	32	32	0	0,2
18 L –	19	20	20	0	0,2
18 L +	36	37	37	0	0,3
18 L #	36	45	41	0	0,3

10.2 - DETERMINACIÓN DE MUTACIONES EN LA ADN-GIRASA Y TOPOISOMERASA IV EN LAS CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI*

Este estudio fue realizado en la cepas de *Escherichia coli* para descubrir mutaciones en las subunidades GyrA y GyrB de la ADN-girasa, o en las subunidades ParC y ParE de la topoisomerasa IV, no encontrándose modificaciones en la GyrB ni en ParE. Los resultados de las mutaciones halladas en GyrA y ParC se exponen en la tabla 75. Este estudio fue realizado por el Dr. Joaquim Ruiz Blázquez bajo la dirección del Profesor Dr. Jordi Vila Estapé, ambos del Departamento de Microbiología del Hospital Clínic i Provincial de Barcelona.

TABLA 75.- MUTACIONES EN GYRA Y PARC DE LAS CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* [a]

Cepas Origen					Cepas Mutantes				
Nº Cepa	Sustituciones en GyrA		Sustituciones en ParC		Nº Cepa	Sustituciones en GyrA		Sustituciones en ParC	
	Ser83 [b]	Asp87 [b]	Ser80 [b]	Glu84 [b]		Ser83 [b]	Asp87 [b]	Ser80 [b]	Glu84 [b]
1P	Leu	—	—	—	1N	Leu	—	—	—
					1L	Leu	—	—	—
2P	—	—	—	—	2N	Leu	—	—	—
					2L	Leu	—	—	—
3P	—	—	—	—	3N	Leu	—	—	—
					3L	Leu	—	—	—
4P	—	—	—	—	4N	Leu	—	—	—
					4L	Leu	—	—	—
5P	Leu	—	—	—	5N	Leu	—	Arg	—
					5L	Leu	—	—	—
6P	—	—	—	—	6N	—	Asn	—	—
					6L	—	Asn	—	—
7P	Leu	—	—	—	7L	Leu	—	—	—
8P	—	—	—	—	8N	Leu	—	—	—
9P	—	—	—	—	9N	Leu	—	—	—
					9L	Leu	—	—	—
10P	Ala	—	—	—	10N	Ala	—	—	—
					10L	Val	—	—	—

[a] Realizado por el Dr. Joaquim Ruiz y el Servicio Científico y Técnico de la Universidad de Barcelona.
[b] Aminoácidos que se expresan en los tipos salvajes de GyrA y ParC.

Sección 4
Discusión



11 DISCUSIÓN

1 - **Estudio de susceptibilidades.**
2 - **Frecuencias de selección y susceptibilidad de las cepas mutantes.**
3 - **Papel de la permeabilidad en el desarrollo de resistencia a quinolonas.**
4 - **Papel de la permeabilidad en el desarrollo de resistencia a otros antimicrobianos.**
5 - **Papel de los sistemas de expulsión activa.**
6 - **Actividad de la ADN-girasa y topoisomerasa IV.**
7 - **Clasificación de los mutantes.**
8 - **Cambios en la expresión de las porinas.**
9 - **Filamentación y selección con CAZ.**
10 - **Ventajas del uso de 0,5% de SDS en los geles de poliacrilamida para separación del LPS de enterobacterias.**

11.1 - ESTUDIO DE SUSCEPTIBILIDADES

Como resultado del estudio de susceptibilidad de 110 cepas de *E. coli* aisladas en el Servicio de Microbiología del Hospital Insular de Gran Canaria, durante el período de 1992-1993, se observó que el 100% de dichas cepas fue sensible a la norfloxacina, lomefloxacina, ciprofloxacina, temafloxacina y ofloxacina, en tanto que el porcentaje de cepas sensibles al ácido pipemídico sólo fue del 99,1% y del 97,3% al ácido nalidíxico. La quinolona más efectiva fue la ciprofloxacina con una CMI_{50}=0,06 mg/l, una CMI_{90}=0,06 mg/l y un rango de 0,06-0,25 mg/l; le siguió en actividad la ofloxacina y temafloxacina, ambas con una CMI_{50}=0,06 mg/l, una CMI_{90}=0,06 mg/l y un rango de 0,06-0,5 mg/l; y la norfloxacina y lomefloxacina, ambas con una CMI_{50}=0,06 mg/l, una CMI_{90}=0,12 mg/l y un rango de 0,06-1 mg/l. Del conjunto de las 110 cepas de *E. coli* estudiadas sólo cuatro cepas se mostraron resistentes al ácido nalidíxico, las denominadas 1P, 5P, 7P y 10P. La CMI del ácido nalidíxico fue ≥512 mg/l frente a las tres primeras, aunque fueron sensibles al resto de quinolonas, excepto al ácido pipemídico (CMI=8-16 mg/l). Sin embargo, la CMI de la lomefloxacina (CMI=1 mg/l) frente a estas cepas estuvo muy cerca del punto de corte considerado según las normas del NCCLS [98, 336, 337]. De igual manera, la cepa 5P, manifestó un nivel de sensibilidad bajo para la norfloxacina (CMI=0,5 mg/l), la ofloxacina (CMI=0,5 mg/l) y la temafloxacina

(CMI=0,5 mg/l). Sin embargo, la cepa 10P, aunque fue resistente al ácido nalidíxico (CMI=32 mg/l), también se mostró muy sensible al resto de quinolonas, en especial a la ciprofloxacina y temafloxacina (CMI=0,06 mg/l) y menos a la ofloxacina (CMI=0,5 mg/l). La CMI_{50} y CMI_{90} del ácido nalidíxico frente a las restantes 106 cepas (CMI_{50}=2 mg/l, CMI_{90}=4 mg/l) es coincidente con los valores descritos en el estudio de J. A. García-Rodríguez y cols. en 1990 sobre 126 cepas de *E. coli* de origen clínico [157].

También en sendos estudios llevados a cabo por Cantón y cols. entre 1989 y 1990 [76, 77] sobre cepas de *E. coli* de origen clínico, la quinolona más efectiva de las ensayadas fue la ciprofloxacina, sin embargo, la CMI_{50} encontrada por ellos fue inferior (CMI_{50}=0,007 mg/l) a la hallada en este trabajo de tesis.

Asimismo, en el estudio de J. A. García Rodríguez y cols. de 1990 [157], ciprofloxacina fue la quinolona más activa de las ensayadas sobre 126 cepas de *E. coli* estudiadas, aunque al igual que en el caso anterior su CMI_{50} fue menor ($CMI_{50} \leq 0,008$ mg/l) que la encontrada en este estudio. En el estudio llevado a cabo por Cantón y cols. [76, 77], a la ciprofloxacina le siguió en orden de actividad la ofloxacina, al igual que en nuestro estudio, pero también con una CMI_{50} inferior (CMI_{50}=0,03 mg/l) a la hallada en este trabajo. De forma similar, en el estudio de García Rodríguez y cols. [157], le siguieron en orden de actividad la ofloxacina y la norfloxacina por igual, con la misma CMI_{50} encontrada en este trabajo de tesis.

En los estudios llevado a cabo por Cantón y cols. [76, 77], a la ciprofloxacina y ofloxacina, siguió en orden de actividad la norfloxacina, al igual que en este estudio y con una CMI_{50} igual a la encontrada aquí y a la recogida en el trabajo de García Rodríguez y cols. [157]

Los trabajos de Cantón y cols. [76, 77] también contemplan la lomefloxacina (CMI_{50}=0,06 mg/l y CMI_{90}=0,25 mg/l) que, según su actividad, quedó por detrás de las ya mencionadas fluoroquinolonas pero con una actividad similar a la encontrada en este trabajo de tesis.

Aunque ya en un estudio de Pérez Trallero y cols. [380], realizado entre los años 1989 y 1993 en *E. coli* aisladas de infecciones urinarias en la provincia de Guipúzcoa, los porcentajes de resistencia a quinolonas son superiores a los descritos en el presente estudio. En concreto, 6-7% de resistentes al ácido nalidíxico, 18% de resistentes al ácido pipemídico, 8,4% de resistentes a norfloxacina y 7,1% de resistentes a ciprofloxacina, frente al 5,8% de resistentes al ácido nalidíxico, 5% de resistentes al ácido pipemídico y 0% de resistentes a norfloxacina o ciprofloxacina encontrados en los aislamientos clínicos de *E. coli* estudiadas en este trabajo de tesis. Asimismo, en dicho estudio de Pérez Trallero y cols., se aprecia un incremento de resistencia a la ciprofloxacina en *E. coli* desde el 0,8% en 1989 hasta el 7,1% en 1992.

También en el estudio multicéntrico realizado por J. A García-Rodríguez y cols., en 1995 [156] sobre 2.426 aislados clínicos de bacterias gramnegativas pertenecientes a pacientes de 18 hospitales españoles en Marzo de 1992, sólo el 92% de las cepas de *E. coli* fueron sensibles a ciprofloxacina. Esto difiere de los valores encontrados en nuestro estudio para dicha quinolona, a la que todas las cepas estudiadas en esta tesis se mostraron sensibles y de un trabajo previo [157] en que la sensibilidad a la ciprofloxacina es del 100% (rango ≤0,008-0,06). Esta diferencia podría estar relacionada con el uso clínico más extendido de la ciprofloxacina en el año 1995.

En un estudio multicéntrico posterior realiza-

do por K. Colom y cols. en 1995 [98], durante los meses de enero a marzo de 1994, con ofloxacina y ciprofloxacina, sobre 2.931 cepas de *E. coli* aisladas en 12 hospitales españoles, se encontró que, durante el período de 1994, la ofloxacina fue la quinolona más activa sobre las cepas de *E. coli* (84,2% de cepas sensibles), superando a la ciprofloxacina (80,9% de cepas sensibles). Sin embargo, los niveles de susceptibilidad recogidos en un trabajo previo del mismo grupo (correspondientes a 1992 y 1993) son más cercanos a los observados en las 110 cepas de *E. coli* aisladas para el desarrollo de esta tesis.

Concretamente, se hallaron sensibles el 90,8% de las cepas de *E. coli* aisladas en 1993 y el 93,9% de las cepas aisladas en el año 1992, lo que supone un alto número de cepas susceptibles a la ciprofloxacina, al igual que ocurre en este trabajo de tesis en el que el 100% de las cepas de *E. coli*, también aisladas en 1992, fueron susceptibles a la ciprofloxacina.

En otro estudio posterior realizado por J. I. Cardenal y cols. en 1996 sobre resistencia de *E. coli* a quinolonas en la provincia de Cáceres, se encontró que el porcentaje de resistencias a ciprofloxacina había aumentado desde un 11,1% en 1993 hasta un 21% en 1995 [78].

Asimismo, en otro estudio multicéntrico más reciente (1998) realizado a nivel nacional por M. Gobernado y cols. [172], y J. Álvarez y cols. [23] sobre cepas de *E. coli*, el 18% fue resistente a la ciprofloxacina, presentando ésta una CMI_{90}=32 mg/l semejante a los valores encontrados por K. Colom y cols [98] en 1995, o por J. I. Cardenal y cols. [78] en 1996 en Cáceres.

En otros trabajos, realizados entre 1992 y 1994, también se ha descrito que la quinolona de mayor actividad fue la ciprofloxacina [227, 415, 458] seguida de la tosufloxacina [332], ofloxacina [332, 415, 458], temafloxacina [458] y norfloxacina [332].

Uno de los últimos estudios, sobre 400 cepas de *E. coli* aisladas en Barcelona, ha sido realizado en 1999 por J. Gómez Martínez y cols [176]. Según sus resultados, la CMI_{90} de ciprofloxacina fue de 32 mg/l, presentándose un 24% de cepas resistentes. Valores similares presentó la esparfloxacina.

Los estudios previamente comentados reflejan un aumento progresivo de la resistencia a las fluoroquinolonas que va desde el 1,2% de cepas resistentes en 1989 hasta el 18% en 1996 [23] y el 24% en 1999 [176].

Asimismo, el 100% de las 110 cepas de *E. coli* estudiadas en esta tesis fueron sensibles a cefazolina, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefpiroma, cefoxitina e imipenem, mientras que sólo el 0,9% fue resistente a ceftizoxima y cefixima. Los valores de CMI_{90} encontrados en esta tesis fueron similares a los valores encontrados por otros autores [177, 375, 460]. Igual ocurrió en los estudios posteriores realizados en 1998 por M. Gobernado y cols. [172], y J. Álvarez y cols. [23] en los que se valoró la susceptibilidad de 1.289 cepas de *E. coli* frente a cefoxitina, cefotaxima, ceftazidima y cefepima, presentando todas ellas una CMI_{90}= 1 mg/l y observándose una resistencia del 3% de las cepas a la cefoxitina y del 0% a las otras tres cefalosporinas.

Vemos pues, por los estudios que se han realizado a lo largo de estos años, que no han variado sustancialmente las resistencias de las cepas de *E. coli* a las diferentes cefalosporinas estudiadas.

En cuanto a las cefalosporinas utilizadas en este estudio de tesis, la más activa fue la ceftizoxima, pero si tenemos en cuenta el conjunto de los β-lactámicos, el más activo

fue el meropenem con una CMI_{50}=0,0035 mg/l. Asimismo, la tetraciclina, gentamicina, tobramicina, amikacina y mitomicina C fueron moderadamente activas, en tanto que todas las cepas fueron resistentes a la acriflavina, novobiocina y bromuro de etidio.

Respecto a la sensibilidad presentada por las cepas origen de otras enterobacterias tratadas en nuestro estudio, podemos mencionar lo siguiente:

La cepa de ***Citrobacter diversus* 12P** se mostró muy sensible a todas las fluoroquinolonas ensayadas, excepto al ácido nalidíxico (CMI=8 mg/l).

En el estudio realizado por García-Rodríguez y cols. en 1990 [157] se encontró que, sobre 42 aislados clínicos de *Citrobacter* spp., la quinolona más activa fue la ciprofloxacina (con una CMI_{50}=0,01 mg/l, una CMI_{90}=0,12 mg/l y un rango de CMI≤0,008-8 mg/l) seguida de la ofloxacina y la norfloxacina, cuyas actividades coinciden con las alcanzadas en la cepa 12P del presente estudio.

En el estudio multicéntrico realizado por K. Colom y cols. en 1995 [98], llevado a cabo durante los meses de enero a marzo de 1994 e incluyendo los resultados para los años 1992 y 1993, nos encontramos, para el año 1994, con valores de sensibilidad a la ofloxacina del 96,9% y del 93,7% a la ciprofloxacina, en tanto que el valor de CMI_{90} de la ofloxacina, entre los diferentes centros, osciló entre <0,06-16 mg/l; oscilando el valor de la CMI_{90} de la ciprofloxacina entre <0,03-8 mg/l. Para los años 1993 y 1992 los valores de sensibilidad a la ofloxacina llegaron al 100%, al igual que los encontrados en el presente estudio.

Resultados similares nos ofrecen otros autores donde siempre aparece la ciprofloxacina como la quinolona más activa frente a *C. diversus* [146, 332, 415, 459].

La cepa de ***Citrobacter freundii* 13P** se mostró sensible a todas las quinolonas (CMI≤0,5 mg/l), en especial a ciprofloxacina y ofloxacina (CMI=0,06 mg/l) y menos para norfloxacina y lomefloxacina (CMI=0,5 mg/l). Asimismo se mostró muy sensible al imipenem (CMI=0,12 mg/l). También se mostró muy sensible a la cefalosporina de 4ª generación ensayada (CMI=0,06 mg/l para la cefpiroma), bastante sensible (CMI≤0,5 mg/l) a las cefalosporinas de 3ª generación ensayadas (cefixima, cefotaxima, ceftazidima, ceftizoxima y ceftriaxona), siendo las más activas la cefotaxima y ceftizoxima con una CMI=0,12 mg/l; pero resistente a la cefalosporina de 2ª generación (CMI de cefoxitina=64 mg/l) y a la de 1ª generación (CMI de cefazolina=16 mg/l) ensayadas. Sin embargo, estas CMIs son menores a las encontradas para las mismas cefalosporinas en un estudio multicéntrico europeo de 1993 [375, 460]. Igualmente, la cepa 13P, se encontró sensible tanto al ácido nalidíxico (CMI=8 mg/l) como al ácido pipemídico (CMI=4 mg/l).

En el estudio realizado por Cantón y cols. en 1989 [76] sobre 25 aislados clínicos de *Citrobacter freundii*, la quinolona más activa fue también la ciprofloxacina (con una CMI_{50}=0,007 mg/l, una CMI_{90}=0,03 mg/l y un rango de 0,007-1 mg/l) seguida de la norfloxacina, ofloxacina y lomefloxacina, cuyas actividades coinciden con las alcanzadas por dichas fluoroquinolonas en la cepa 13P del presente estudio.

Estos datos también están en concordancia con el estudio posterior que hicieron E. Cantón y cols. en 1992 [77].

En el estudio realizado por J. A. García-Rodríguez y cols. en 1990 [157] también se encontró que, sobre 42 aislados clínicos de *Citrobacter* spp., la quinolona más activa fue también la ciprofloxacina (con una CMI_{50}=0,01 mg/l, una CMI_{90}=0,12 mg/l y un rango de ≤0,008-8 mg/l) seguida de la ofloxacina y la norfloxacina. Las sensibilidades mostradas por las cepas de dicho estudio también coinciden con la mostrada por la

cepa *Citrobacter freundii* 13P estudiada en esta tesis.

En el estudio multicéntrico realizado por K. Colom y cols. en 1995 [98], nos encontramos para el año 1994 con mayores valores de CMIs de las fluoroquinolonas en *C. freundii*, mostrando la ofloxacina una CMI_{90} =0,5->64 mg/l y la ciprofloxacina una CMI_{90} =0,06-64 mg/l. El número de cepas sensibles a la ofloxacina fue del 81,2%, en tanto que el 73,9% se mostró sensible a la ciprofloxacina. En cambio el 95,2% de las cepas de *C. freundii* aisladas en 1993 se mostró sensible a la ofloxacina, así como el 96,8% de las cepas aisladas durante 1992, valores que están más en concordancia con nuestros hallazgos para el mismo período 1992-1993 y para la cepa *Citrobacter freundii* 13P (sensibilidad 100%).

En otros estudios multicéntricos posteriores realizados en 1998 por M. Gobernado y cols. [172], y J. Álvarez y cols. [23], la CMI_{90} de ciprofloxacina observada en 46 cepas de *C. freundii* fue de 0,25 mg/l y su nivel de susceptibilidad del 93%.

Resultados similares encontramos en otros trabajos relacionados [227, 332, 415, 458].

Como se puede observar por estos últimos estudios, la susceptibilidad de las cepas de esta especie a las fluoroquinolonas ha ido disminuyendo ligeramente desde 1992 (96,8%) a 1998 (93%).

Las cepas de ***Enterobacter cloacae* 14P y 15P** mostraron una alta sensibilidad a todas las fluoroquinolonas ensayadas con una CMI ≤ 0,12 mg/l, mientras que las CMIs del ácido nalidíxico y del ácido pipemídico fueron algo superiores (CMI ≤ 2 mg/l), lo que coincide con los resultados de otros estudios coetáneos [76, 77, 157].

Así, en el estudio realizado por E. Cantón y cols. en 1989 [76] sobre 53 aislados clínicos de *Enterobacter* spp., de los cuales 18 fueron *E. cloacae*, la quinolona más activa fue también la ciprofloxacina (con una CMI_{50}=0,03 mg/l, una CMI_{90}=0,5 mg/l y un rango de 0,15-1 mg/l) seguida de la norfloxacina, ofloxacina y lomefloxacina, cuyas actividades coinciden con las alcanzadas en las cepas del presente estudio.

Estos datos también están en concordancia con el estudio posterior que hicieron E. Cantón y cols. en 1992 [77].

En el estudio realizado por J.A. García-Rodríguez y cols. en 1990 [157] sobre 42 aislados clínicos de *Enterobacter* sp., se encontró que la quinolona más activa fue también la ciprofloxacina (con una CMI_{50}≤0,008 mg/l, una CMI_{90}=0,12 mg/l y un rango de ≤0,008-0,25 mg/l) y que, en las cepas de este género, la sensibilidad a las restantes quinolonas como norfloxacina, ofloxacina y ácido nalidíxico coinciden con las sensibilidades alcanzadas por las cepas de *E. cloacae* de nuestro estudio.

En el estudio multicéntrico realizado por K. Colom y cols. en 1995 [98], nos encontramos que, para el año 1994, los valores de CMI de las fluoroquinolonas frente a las cepas de *E. cloacae* fueron ligeramente superiores a los encontrados en el presente estudio, mostrando la ciprofloxacina una CMI_{90} <0,03-0,25 mg/l y la ofloxacina una CMI_{90} =0,06-1 mg/l. El número de cepas sensibles a la ofloxacina fue del 98,4%, en tanto que el 95,1% se mostró sensible a la ciprofloxacina. En cambio, el 95,3% de las cepas de *E. cloacae* aisladas en 1993 se mostró sensible a la ofloxacina, así como el 97,4% de las cepas aisladas durante 1992, valores que, aunque continúan siendo ligeramente inferiores, están más en concordancia con los resultados de esta tesis para el mismo período 1992-1993 y para las cepas *Enterobacter cloacae* 14P y *Enterobacter cloacae* 15P (sensibilidad 100%).

En otros estudios multicéntricos posteriores realizados en 1998 por M. Gobernado y cols. [172], y J. Álvarez y cols. [23], en 95 cepas

de *E. cloacae*, la CMI_{90} de ciprofloxacina observada fue de 0,25 mg/l y el nivel de susceptibilidad a esta fluoroquinolona del 96%.

Resultados similares encontramos en trabajos de otros autores [227, 332, 415, 458].

Como se puede observar por estos últimos estudios, la susceptibilidad a la ofloxacina de las cepas de *Enterobacter cloacae* aisladas en hospitales españoles, disminuyó de 1992 (97,4%) a 1993 (95,3%) pero aumentó desde 1993 (95,3%) a 1994 (98,4%), en tanto que la susceptibilidad a la ciprofloxacina aumentó ligeramente desde 1994 (95,1%) a 1998 (96%).

Por su parte, de los antibióticos β-lactámicos ensayados el imipenem fue el más activo, al que las cepas 14P y 15P fueron muy sensibles. En este sentido, la resistencia a imipenem y también a cefalosporinas de amplio espectro descrita en cepas de *E. cloacae* se ha asociado a la pérdida de la porina F [4, 90, 99, 109, 131, 398, 456, 467, 468] junto a la hiperproducción de β-lactamasas clase C, tal como se ha demostrado en estudios de otros autores [99, 106, 131, 178, 303, 327, 334, 345, 352, 444, 456, 463, 467, 468]. Hay que tener en cuenta que una permeabilidad reducida a dichos antibióticos facilita la acción de este tipo de β-lactamasas sobre las moléculas de cualquier antibiótico β-lactámico que penetre en el espacio periplásmico bacteriano. Asimismo, la hiperproducción de este tipo de cefalosporinasas por sí misma puede ser causa de resistencia a cefalosporinas de amplio espectro, aunque no a carbapenemas, como se ha constatado también en otros trabajos previos [303, 451, 452]. Éste podría ser el caso de la cepa *E. cloacae* 15P, resistente a todas las cefalosporinas ensayadas (a diferencia de la cepa 14P que sólo fue resistente a las cefalosporinas de 1ª y 2ª generación). Aunque la posible implicación de una permeabilidad reducida, en la resistencia de la cepa 15P a las cefalosporinas será analizada más detenidamente en apartados posteriores de esta discusión.

La cepa de ***Klebsiella pneumoniae* 16P** se mostró muy sensible a todas las quinolonas (CMI=0,06 mg/l) excepto a la temafloxacina que quedó en el límite de sensibilidad (CMI=1 mg/l). Asimismo, se mostró muy sensible al imipenem (CMI=0,12 mg/l), muy sensible a la cefpiroma (CMI=0,12 mg/l) y bastante sensible a las cefalosporinas de 3ª generación (CMI≤2 mg/l), siendo las más activas la ceftazidima, ceftizoxima y ceftriaxona (con una CMI=0,06 mg/l). De igual forma, se mostró sensible para las cefalosporinas de 1ª y 2ª generación ensayadas (CMI=2 mg/l para la cefazolina y cefoxitina). Asimismo, esta cepa se mostró sensible tanto al ácido nalidíxico (CMI=0,25 mg/l) como al ácido pipemídico (CMI=0,25 mg/l).

En el estudio realizado por E. Cantón y cols. en 1989 [76] sobre 35 aislados clínicos de *Klebsiella* spp., de los cuales 21 fueron *K. pneumoniae*, la quinolona más activa fue también la ciprofloxacina (con una CMI_{50}=0,03 mg/l, una CMI_{90}=0,06 mg/l y un rango de 0,015-0,25 mg/l) seguida de la lomefloxacina, ofloxacina y norfloxacina, cuyas actividades coinciden con las alcanzadas por las misma quinolonas sobre la cepa del presente estudio.

Estos datos también están en concordancia con el estudio posterior que hicieron E. Cantón y cols. en 1992 [77].

En el estudio realizado por J. A. García-Rodríguez y cols. en 1990 [157] sobre 63 aislados clínicos de *K. pneumoniae*, se encontró que la quinolona más activa fue también la ciprofloxacina (con una CMI_{50}≤0,008 mg/l, una CMI_{90}=0,12 mg/l y un rango de ≤0,008-0,5 mg/l), y que la sensibilidad a las restantes quinolonas como ofloxacina y norfloxacina coinciden con las sensibilidades de la cepa *Klebsiella pneumoniae* 16P del presente estudio, en tanto que para el ácido nalidíxico encontraron un nivel menor de sensibilidad (CMI_{50}=4 mg/l, una CMI_{90}=128

mg/l y un rango de 2-≥128 mg/l) en el trabajo citado que el valor encontrado para la misma quinolona (CMI=0,25 mg/l) en la cepa 16P.

Aunque en el estudio multicéntrico realizado por K. Colom y cols. en 1995 [98], nos encontramos, para el año 1994, con valores de CMIs de las fluoroquinolonas para *K. pneumoniae* ligeramente superiores a los encontrados en el presente estudio. Sin embargo, los valores de CMIs encontrados por otros autores [227, 332, 415, 458] resultan similares a los observados en la cepa *Klebsiella pneumoniae* 16P, aislada en el mismo período 1992-1993.

En otros estudios multicéntricos posteriores realizados en 1998 por M. Gobernado y cols. [172], y J. Álvarez y cols. [23], la CMI_{90} de ciprofloxacina observada en 151 cepas de *K. pneumoniae* fue de 0,12 mg/l y su nivel de susceptibilidad del 96%.

Como se puede observar por estos últimos estudios, la susceptibilidad de las cepas de *K. pneumoniae* a las fluoroquinolonas ha ido disminuyendo desde 1992 (98,5%) [98] a 1998 (96%) [23, 172].

La cepa de ***Proteus vulgaris*** **17P**, al igual que las descritas en otros estudios [76, 77, 157] de la misma época en que se aisló esta cepa, se mostró muy sensible a las fluoroquinolonas estudiadas (CMI≤0,12 mg/l). Tanto en esos estudios [76, 77, 157] como en el de este trabajo de tesis, la ciprofloxacina fue la fluoroquinolona más activa seguida de la norfloxacina, ofloxacina y lomefloxacina. Las quinolonas más antiguas como el ácido nalidíxico y el ácido pipemídico fueron algo menos activas sobre la cepa 17P (CMI=4 mg/l) como lo fueron también en las cepas descritas en estudios previos [76, 77, 157].

Asimismo, en el estudio multicéntrico realizado por K. Colom y cols. en 1995 [98], nos encontramos para el año 1994, en *P. vulgaris*, con unos valores de CMI_{90} <0,03-32 mg/l para la ciprofloxacina y CMI_{90} <0,06-16 mg/l para la ofloxacina, valores que coinciden con el encontrado en el presente estudio. Según este estudio de K. Colom y cols., el número de cepas sensibles a la ofloxacina fue del 93,5%, en tanto que el 90,3% se mostró sensible a la ciprofloxacina. En cambio, el 97,9% de las cepas de aisladas en 1993 se mostró sensible a la ofloxacina, así como el 100% de las cepas aisladas durante 1992. Los mencionados valores de CMI para ciprofloxacina y ofloxacina coinciden con los valores encontrados en la cepa de *Proteus vulgaris* 17P, aislada en el mismo período 1992-1993. Resultados similares encontramos en trabajos coetáneos de otros autores [227, 332, 415]. Como se puede observar en el estudio de K. Colom y cols. en 1995 [98], el número de cepas de *P. vulgaris* resistentes a las quinolonas aumentó de 1992 a 1994.

Asimismo, la susceptibilidad de la cepa 17P a cefalosporinas de 2ª, 3ª y 4ª generación ensayadas coincide con las descripciones de otros autores sobre susceptibilidad a β-lactámicos en cepas de *Proteus vulgaris* de origen clínico. Por su parte, la resistencia a cefazolina (cefalosporina de 1ª generación) es común sobre todo en cepas de enterobacterias productoras de cefalosporinasas cromosómicas inducibles como es el caso de *Proteus vulgaris* [70, 71, 279, 500].

La cepa de ***Salmonella enteritidis*** **18P**, al igual que las descritas en otros estudios [76, 77, 157] de la misma época en que se aisló ésta cepa, se mostró muy sensible a todas las fluoroquinolonas estudiadas (CMI≤0,12 mg/l). Tanto en esos estudios [76, 77, 157] como en el de este trabajo de tesis, la ciprofloxacina fue la fluoroquinolona más activa seguida de la ofloxacina, norfloxacina y lomefloxacina. Las quinolonas más antiguas, como el ácido nalidíxico y el ácido pipemídico, fueron algo menos activas (CMI≤8 mg/l) sobre la cepa 18P como lo fueron también en las cepas descritas en estudios previos [76, 77, 157].

Asimismo, en el estudio multicéntrico reali-

zado por K. Colom y cols. en 1995 [98], nos encontramos para el año 1994, en *Salmonella* spp., con valores de CMI_{90} $\leq$0,06-0,25 mg/l para la ciprofloxacina y de CMI_{90} <0,06-2 mg/l para la ofloxacina, valores que también coinciden con los encontrados en el presente estudio sobre la cepa 18P. Resultados similares encontramos en trabajos coetáneos de otros autores [227, 332].

En otros estudios multicéntricos posteriores realizados en 1998 por M. Gobernado y cols. [172], y J. Álvarez y cols. [23], la CMI_{90} de ciprofloxacina observada en 60 cepas de *Salmonella* spp. fue de 0,25 mg/l y el nivel de susceptibilidad a esta fluoroquinolona del 93%.

Como se puede observar por estos últimos estudios, el porcentaje de cepas susceptibles a las fluoroquinolonas en *Salmonella* spp. ha ido disminuyendo desde 1992 (100%) [98] hasta 1998 (93%) [23, 172].

Asimismo, la susceptibilidad de la cepa 18P a cefalosporinas de 1ª, 2ª, 3ª y 4ª generación ensayadas coincide con las descripciones de otros autores sobre susceptibilidad a β-lactámicos en cepas de *Salmonella* spp. de origen clínico.

11.2 - FRECUENCIAS DE SELECCIÓN Y SUSCEPTIBILIDAD DE LAS CEPAS MUTANTES

En las cepas de *E. coli* seleccionadas con quinolonas, se obtuvo una mayor frecuencia de selección con lomefloxacina ($7{\cdot}10^{-6}$ – $1{\cdot}10^{-8}$), que con norfloxacina ($6{\cdot}10^{-6}$ – $7{\cdot}10^{-10}$). Ambas frecuencias son similares a las encontradas en *E. coli* por otros autores [196, 223, 479, 480].

Estas frecuencias de selección fueron coincidentes con las CMIs de los agentes selectivos ya que el rango de CMI, así como las CMI_{50} y CMI_{90} de la lomefloxacina, fueron superiores en el conjunto de las cepas de *E. coli* origen (1P a 10P) que las de la norfloxacina sobre el mismo grupo de cepas.

Por el contrario, en las otras enterobacterias estudiadas (cepas 12P a 18P) se obtuvo mayor frecuencia de selección con la norfloxacina ($4{\cdot}10^{-5}$ – $1{\cdot}10^{-9}$), que con la lomefloxacina ($8{\cdot}10^{-6}$ – $9{\cdot}10^{-9}$), alcanzando en las cepas *Enterobacter cloacae* 14L, *K. pneumoniae* 16L y *K. pneumoniae* 16N niveles de resistencia 512 veces superiores a los de la cepa origen y llegando a presentar una CMI=128 mg/l de lomefloxacina o norfloxacina las cepas *E. cloacae* 15N y *K. pneumoniae* 16N.

En este contexto, las frecuencias de selección de norfloxacina sobre otras especies de enterobacterias fueron coincidentes con los resultados de Watanabe y cols. 1990 [480]. Estas frecuencias de selección fueron coincidentes con los valores de CMI de los agentes selectivos y estuvieron en el mismo rango que los hallados en trabajos previos de otros autores [479, 480].

La frecuencia de selección con ceftazidima, en las cepas de *E. coli*, estuvieron en el mismo rango que las obtenidas con NOR y LMF en las cepas origen de dicha especie bacteriana.

Tanto los mutantes de *E. coli* seleccionados con norfloxacina (NOR) como los seleccionados con lomefloxacina (LMF) aumentaron su resistencia simultáneamente a todas las fluoroquinolonas ensayadas. El desarrollo de resistencias cruzadas entre quinolonas y, sobre todo, entre fluoroquinolonas en cepas de enterobacterias o entre bacilos gramnegativos en general, ha sido ampliamente demostrado en trabajos previos [20, 37, 196, 458, 480].

El estudio estadístico de este hecho en la población de mutantes de *E. coli* de esta tesis, mediante el análisis de la correlación por el método de Spearman, demostró una alta correlación entre las CMIs presentadas por los mutantes frente al resto de quinolonas, apreciándose un rango de r=0,45-0,97. Aunque el índice de correlación de Spearman entre las CMIs de las fluoroquinolonas en los mutantes fue mayor que entre cualquier nueva fluoroquinolona y antiguas quinolonas como el ácido nalidíxico o el ácido pipemídico, la explicación de este hecho debe residir tanto en el diferente efecto de un mismo mecanismo de resistencia frente a unas y otras quinolonas, como en las características físicas de las moléculas que pueden dificultar su acción. En este sentido, las fluoroquinolonas (pero no el ácido nalidíxico) han sido reconocidas como sustratos de una bomba de expulsión activa en *E. coli*, el sistema AcrAB [292, 293, 328, 343, 357, 441, 454]. Asimismo, la hidrofobicidad de la molécula de ácido

nalidíxico con respecto a las fluoroquinolonas ensayadas dificulta más su penetración incluso en cepas sin deficiencia de porinas [204, 220, 221].

En todos los mutantes seleccionados con norfloxacina o lomefloxacina se aprecia también un aumento simultáneo de la resistencia a diversos antibióticos β-lactámicos, cuyo valor de CMI_{50} se ve incrementado hasta en 8 veces (cefoxitina, cefotaxima y meropenem) y a otros antimicrobianos como mitomicina-C ($CMI_{50} \times 8$) y novobiocina ($CMI_{50} \times 16$), lo que es frecuente en mutantes que desarrollan altos niveles de resistencia a fluoroquinolonas. Por lo tanto, se puede decir que son mutantes con fenotipos de múltiple resistencia a antimicrobianos [96, 173, 298, 357]. Diversos factores han sido involucrados en el desarrollo de resistencia en este tipo de mutantes en *E. coli* (mutantes Mar), tales como la expresión del sistema de expulsión activa AcrAB [8, 89, 95, 96, 328, 343, 355, 357, 441, 454] y la expresión disminuida de la porina F [8, 89, 96, 97]. La participación de estos mecanismos en los mutantes estudiados será analizada en apartados posteriores.

Por el contrario, todos los mutantes seleccionados, presentan una disminución de la resistencia para otros antimicrobianos como los aminoglucósidos que ven reducida su CMI_{50} a la mitad. Aunque este incremento de susceptibilidad podría tener su origen en cambios en la composición del lipopolisacárido asociados al desarrollo de altos niveles de resistencia a fluoroquinolonas que podrían afectar a la penetración de aminoglucósidos, tal como se ha descrito previamente en cepas de *E. coli* y otras bacterias gramnegativas [65, 190, 313, 397].

De igual forma, hay que destacar la correlación entre las CMIs de las cepas seleccionadas a norfloxacina y las CMIs de otros antimicrobianos, siendo interesante señalar una alta correlación entre las CMIs de norfloxacina y de cefalotina (r=0,73), así como entre las CMIs de norfloxacina y de novobiocina (r=0,72). Este resultado podría tener su explicación en que tanto la cefalotina como la novobiocina comparten sistema de expulsión activa con las fluoroquinolonas [8, 292, 293], además de la influencia que tendría la pérdida de expresión de la porina F tanto en la penetración de cefalotina como de las fluoroquinolonas ensayadas como han descrito trabajos previos [75, 96, 204, 220, 221, 329, 385].

Asimismo, respecto a la correlación entre las CMIs de las cepas seleccionadas a la lomefloxacina y las CMIs de otros antimicrobianos, hay que señalar una alta correlación entre las CMIs de la lomefloxacina con la ticarcilina (r=0,71), ceftazidima (r=0,65), imipenem (r=0,64) y ceftizoxima (r=0,64). Indicando quizás la pérdida de la porina F en varias de las cepas seleccionadas con lomefloxacina, o bien la existencia de bombas de expulsión activa comunes para estos antimicrobianos, lo que será analizado en posteriores apartados.

De igual forma, en el desarrollo de este tipo de mutantes de *E. coli* multirresistentes obtenidos en este trabajo de tesis, el aumento de los niveles de resistencia a otros antimicrobianos que también son sustratos del sistema de expulsión activa AcrAB, como la tetraciclina y la acriflavina, podría justificarse mediante la participación de este tipo de mecanismo de resistencia [173, 298, 301, 355, 357, 370, 385].

Por otra parte, las cepas mutantes de otras especies de enterobacterias seleccionadas con norfloxacina (NOR) o lomefloxacina (LMF) también aumentaron su resistencia simultáneamente a todas las fluoroquinolonas, como también se puede observar en trabajos previos [20, 37, 196, 458, 480]. Tanto la CMI de norfloxacina como de lomefloxacina aumentaron en un rango de 32 a 512 veces en las cepas mutantes seleccionadas con estos antimicrobianos [20, 37, 458, 480].

En el estudio de la población de mutantes de otras enterobacterias de esta tesis, se observó

una alta relación entre las CMIs presentadas por los mutantes al conjunto de quinolonas. Las diferencias entre unas y otras debe residir, al igual que ocurre en el caso de las cepas de *E. coli*, en las diferencias existentes en el efecto de los mecanismos de resistencia frente a unas y otras quinolonas, así como en las características químicas diferenciales de cada una de las moléculas de antimicrobiano. Hay que señalar que, al igual que en las cepas de *E. coli* se ha descrito el sistema de expulsión activa AcrAB, deben de existir otros sistemas similares en las otras especies de enterobacterias. De hecho, un sistema de bomba de expulsión activa AcrAB se ha identificado también en *Salmonella typhimurium* [343].

En todos los mutantes de otras especies de enterobacterias diferentes de *E. coli*, seleccionados con norfloxacina o lomefloxacina, se apreció también un aumento simultáneo de la resistencia a diversos antibióticos β-lactámicos, cuyo valor de CMI_{50} se vió incrementado hasta en 8 veces. Esto es frecuente en mutantes con fenotipos de múltiple resistencia a antimicrobianos y que podrían deberse a la acción de los sistemas de expulsión activa homólogos del sistema AcrAB de *E. coli* [8, 232, 233, 328, 343], así como a la disminución de permeabilidad por disminución de la expresión de porinas homólogas a la porina F de *E. coli* [8, 109, 232, 258, 259, 269, 306, 484], lo que es concordante con los resultados del estudio de correlación. La participación de estos mecanismos en los mutantes estudiados será analizada en apartados posteriores.

Asimismo, los mutantes desarrollados tras selección con ceftazidima también presentaron fenotipos de múltiple resistencia, incluyendo quinolonas, β-lactámicos, tetraciclina y aminoglucósidos, por lo que la disminución de la permeabilidad de su membrana externa por pérdida de la porina F, y la posible implicación de sistemas de expulsión activa, podrían estar presentes en estos mutantes '[83, 84, 317, 327].

A la vista de los resultados comentados, está claro que, tanto en los mutantes desarrollados *in vitro* a partir de aislamientos clínicos de diferentes especies de enterobacterias, como en los aislamientos resistentes descritos por otros autores en años posteriores (1994-1999), es común el fenotipo de resistencia múltiple a antimicrobianos, tanto bajo la presión selectiva de fluoroquinolonas como de otros agentes antimicrobianos [97, 109, 164, 355, 387, 397]. Estos fenotipos de resistencia a múltiples antimicrobianos suelen con frecuencia asociarse a altos niveles de resistencia a quinolonas [8, 109, 173, 217, 220, 298, 355, 387, 487], tal como se ha observado en los mutantes resistentes objeto de esta tesis.

Como confirmación de este hecho, algunos autores se han encontrado en los cuatro últimos años con aislamientos clínicos, no sólo en humanos sino también en animales, con niveles de resistencia a quinolonas similares (CMI de ciprofloxacina $\geq$ 8 mg/l) [26], (CMI de ciprofloxacina y esparfloxacina de hasta 16 mg/l en pollos) [43] o claramente superior (CMI de ciprofloxacina de hasta 128 mg/l) [120, 135, 413, 470], (CMI de norfloxacina y pefloxacina de hasta 128 mg/l y de ofloxacina de hasta 32 mg/l en pollos) [43], a las que presentan las cepas mutantes seleccionadas en esta tesis a esos antimicrobianos; incluso, en otros estudios, se han llegado a aislar mutantes *in vitro* con muy altos grados de resistencia a quinolonas (CMI de ofloxacina =3000 mg/l) [449].

En este contexto, tanto en esta tesis como por otros autores, se ha confirmado que los mecanismos que han dado lugar al desarrollo de resistencias a fluoroquinolonas *in vitro* son los que están dando lugar al desarrollo de resistencias en enterobacterias *in vivo* a lo largo de los últimos años, es decir, mutaciones en las topoisomerasas bacterianas [43, 57,

115, 120, 135, 195, 263, 354, 384, 414, 465, 470, 472, 483], expresión de las bombas de expulsión activas [8, 26, 135, 168, 232, 233, 296, 298, 305, 328, 343, 355, 357, 370, 385, 441, 454, 480] y disminución en la expresión de porinas [8, 75, 232, 296, 298, 305, 329, 385, 480].

11.3 - PAPEL DE LA PERMEABILIDAD EN EL DESARROLLO DE RESISTENCIA A QUINOLONAS EN *E. COLI*

El papel de las proteínas y del lipopolisacárido de la membrana externa en el desarrollo de resistencia a quinolonas se estudió mediante la comparación de los distintos mutantes con sus cepas origen. El análisis en geles de poliacrilamida con dodecil-sulfato-sódico y urea reveló que el incremento de resistencia a quinolonas se asoció a la falta de expresión de la porina F de *E. coli* en once de los dieciocho mutantes seleccionados con norfloxacina o lomefloxacina (las cepas 1N, 2N, 2L, 3N, 3L, 4L, 5N, 5L, 8N, 9L y 10N). Asimismo, los mutantes 1N y 9L no expresaron una banda electroforética de movilidad similar a la porina C de *E. coli* KL16 [221]. En este contexto, trabajos previos han demostrado cómo diferentes mutaciones tales como *marA* [8, 96, 97, 321], *soxQ1* [8, 89, 321], *nfxB, cfxB1* [221, 321], *nfxC1* [221],...reducen la expresión del gen *ompF* tras la transcripción y que esta reducción es debida a la expresión del locus *micF* que codifica una cadena de ARN complementaria al ARN mensajero de *ompF* [8, 96, 97, 180, 221]. Sin embargo, la pérdida de expresión de la porina F no siempre estuvo acompañada de un decremento apreciable en la acumulación de norfloxacina en la célula bacteriana. Sólo ocho de los once mutantes que no expresaron la porina F (las cepas 1N, 2N, 2L, 4L, 5N, 5L, 8N y 9L) mostraron una menor acumulación de norfloxacina que las respectivas cepas origen. Las cepas 3N, 3L y 10N no mostraron menor acumulación que sus cepas origen a pesar de perder la expresión de la porina F. La explicación de este último hallazgo podría residir en el bajo nivel de acumulación de norfloxacina que ya presentaban previamente sus cepas origen. En concreto, las cepas 3P y 10P mostraron un nivel medio de norfloxacina acumulada que fue 11% y 42% respectivamente de lo que en las mismas condiciones de experimentación acumuló la cepa *E. coli* KL16 [204]. Posiblemente ambas cepas origen disponen de mecanismos que ya se han descrito previamente en cepas de *E. coli* [204, 292, 293, 346, 370] y que expelen la norfloxacina al exterior, ya que ambas, como el resto de las nueve cepas de *E. coli* origen de este trabajo de tesis, no presentaban pérdida de expresión de la porina F. En este sentido, la activación de los sistemas de expulsión activa bacterianos ha sido implicada en el desarrollo de resistencia a quinolonas en *E. coli* y otras especies bacterianas [204, 292, 293, 298, 357]. Asimismo, es frecuente encontrar la coincidencia de varios mecanismos como causas del desarrollo de resistencia a fluoroquinolonas tanto en *E. coli* como en otras enterobacterias. Diversos autores han propuesto la hipótesis de que el desarrollo de alto nivel de resistencia a fluoroquinolonas (como es el caso de los mutantes de *E. coli* estudiados en este trabajo de tesis) implican

la presencia de mutaciones que afecten a varios *loci* cromosómicos, comprometiendo tanto genes estructurales como reguladores [135, 184, 355]. Este es un hallazgo que frecuentemente se presenta tanto en aislamientos clínicos como en cepas resistentes desarrolladas *in vitro* y tanto en *E. coli* [135, 221, 355] como en otras enterobacterias [168, 290, 296, 414].

Por otra parte, otros autores han descrito la asociación de cambios en la expresión del lipopolisacárido de la membrana externa con el desarrollo de resistencia a quinolonas en enterobacterias [135, 203, 326]. Se ha propuesto que el nivel de expresión del antígeno O podría influir en la penetración de quinolonas con mayor coeficiente de partición a través de la membrana externa [64, 203], como sería el caso del ácido nalidíxico de manera que un incremento de expresión en las cadenas laterales hidrofílicas de dicha macromolécula dotaría de una mayor hidrofilicidad a la membrana externa bacteriana, dificultando la penetración de moléculas que utilicen esta vía [64, 203]. Por el contrario una pérdida de expresión del antígeno O, y por tanto un fenotipo rugoso, como el que encontramos en las cepas 5P, 5N, 6P, 8P y 10N [135], contribuiría a la mejor penetración de la molécula de ácido nalidíxico en la célula bacteriana de *E. coli* [203, 326]. En este contexto, las cepas 5N y 10N de forma similar a los mutantes de *E. coli* conocidos como NorC [135, 326], mostraron un fenotipo de lipopolisacárido rugoso, la pérdida de expresión de la porina F y un nivel de acumulación de norfloxacina menor del 50% que el nivel acumulado por la cepa *E. coli* KL16 (cepa sensible utilizada como control en este trabajo de tesis). Sin embargo, no todos los autores están de acuerdo en el posible papel del LPS en el desarrollo de resistencia a quinolonas. En cualquier caso, lo que sí parece cierto, es que mutaciones conducentes a cambios en la expresión del AgO aparecen con cierta frecuencia asociadas al desarrollo de altos niveles de resistencia a fluoroquinolonas [135, 326]. De todas formas, lo más común entre los dieciocho mutantes de *E. coli* estudiados fue el fenotipo de LPS liso y la ausencia de cambios en el LPS con respecto a las respectivas cepas origen coincidiendo con resultados de otros trabajos previos [135].

11.4 - PAPEL DE LA PERMEABILIDAD DE *E. COLI* EN EL DESARROLLO DE RESISTENCIA A OTROS ANTIMICROBIANOS

La pérdida de expresión de la porina F que experimentaron algunos mutantes resistentes a quinolonas indudablemente debió influir en la penetración de antibióticos como cefalotina o cefoxitina y otras cefalosporinas cuya difusión relativa a través de esta porina es notable [506]. En este sentido, las cepas mutantes 1N, 2N, 2L, 3N, 3L, 4L, 5N, 5L, 8N, 9N, 9L y 10N que perdieron la expresión de la porina F no sólo experimentaron un incremento de resistencia a quinolonas sino también a las cefalosporinas ensayadas; como por ejemplo, los incrementos de hasta 32 veces de las CMIs de la cefalotina y la cefoxitina. Sin embargo, la pérdida de la porina F en la cepa control *E. coli* JF703 sólo resultó en un incremento de 4 veces la CMI de la cefoxitina respecto a la cepa control *E. coli* KL16 [329]. De acuerdo con los resultados de estudios previos sobre influencia de la porina F y de la porina C de *E. coli* en el desarrollo de resistencia a β-lactámicos, incrementos superiores a 4-8 veces en la CMI de β-lactámicos como la cefoxitina o cefalotina [329, 345, 347] se explican sólo por la simultánea coincidencia de otros mecanismos de resistencia [347] desarrollados por los mutantes a la vez que la pérdida de la porina F, por ejemplo la expresión de sistemas de expulsión activa para β-lactámicos [345, 346].

Por otra parte, tanto los β-lactámicos como otras moléculas penetran en mayor o menor grado a través de la porina C de *E. coli* según las características de su molécula [506]. El papel de la pérdida de ambas porinas en el desarrollo de resistencia a antibióticos β-lactámicos se aprecia mejor si comparamos el incremento de las CMI de diferentes β-lactámicos en los mutantes seleccionados con quinolonas 1N y 9L. Ambas cepas mostraron una pérdida simultánea en la expresión de las porinas F y C. La falta de expresión de ambas porinas en la cepa mutante 1N determinó probablemente, que las CMIs de cefalotina y cefoxitina fueran superiores en la cepa 1N que en la 1L. Sin embargo, la cepa mutante 1L a pesar de mostrar el mismo perfil electroforético en sus proteínas de membrana externa que su cepa origen 1P, fue 2-8 veces más resistente a las cefalosporinas ensayadas que dicha cepa origen. Por su parte, la cepa 9L fue más resistente a cefoxitina que la 9N (aunque no a cefalotina), resultado que probablemente fue determinado por la coincidencia de ausencia de porinas F y C en dicha cepa (9N no expresó sólo la porina F).

En cualquier caso, los dieciocho mutantes seleccionados con fluoroquinolonas incrementaron su resistencia a los β-lactámicos ensayados: 2-16 veces a ceftazidima, 2-32 veces a cefotaxima y 2-32 veces a cefoxitina, a pesar de que sólo once de ellos mostraron la falta de expresión de la porina F y de la porina C en dos casos. En consecuencia, es probable que en estos mutantes puedan estar actuando mecanismos que expelen dichos antibióticos al exterior celular, aumentando con ello la resistencia de esos mutantes a dichos antimicrobianos. En este sentido, la cefalotina ha sido descrita como sustrato del sistema de expulsión activa AcrAB en *E. coli* [292, 293, 357]. Asimismo, diferentes cefalosporinas han sido identificadas como sustratos de bombas de expulsión activa en otras bacterias gramnegativas [346, 370].

Por otro lado, los tres mutantes seleccionados con ceftazidima, no expresaron la porina F, lo que podría explicar, en parte, su incremento de resistencia no sólo a β-lactámicos, sino también a quinolonas y tetraciclina '[83, 84, 317, 327].

11.5 - PAPEL DE LOS SISTEMAS DE EXPULSIÓN ACTIVA EN *E. COLI*

Por otra parte, el estudio de la acumulación celular de norfloxacina demostró que las 10 cepas origen mostraron un menor nivel de acumulación que la cepa *E. coli* KL16 a pesar de que todas ellas expresaron la porina F. En concreto, siete de las cepas origen acumularon menos del 50% de la norfloxacina que acumuló en las mismas condiciones la cepa sensible utilizada como control (*E. coli* KL16). Este hallazgo es concordante con los resultados de otros estudios en los que aislamientos clínicos susceptibles a quinolonas ya presentan defectos en la acumulación de norfloxacina [196, 298]. En este sentido, la adición de 50 ó 100 μM de CCCP resultó en un incremento de la acumulación de norfloxacina en todas las cepas origen estudiadas, a excepción de las cepas 2P, 3P y 4P, indicando que el transporte transmembrana protón dependiente estaba determinando, al menos en parte, la menor acumulación de norfloxacina de siete cepas origen (1P, 5P, 6P, 7P, 8P, 9P y 10P) debido al efecto del CCCP, tal como describen trabajos previos [135, 357].

También, en once de las cepas mutantes estudiadas se observó una menor acumulación de norfloxacina que en las cepas origen aunque en tres de ellas (6N, 6L, 9N) no se asoció a la pérdida de la porina F. En estas tres últimas cepas la presencia de CCCP condujo a un nivel de acumulación que fue cuando menos el doble que el obtenido sin la presencia del inhibidor del gradiente protónico transmembrana, confirmando la participación de la expulsión activa en el desarrollo de resistencia a norfloxacina en estos tres mutantes. En el resto de los mutantes seleccionados, a excepción de las cepas 3N, 3L y 4N, la presencia del transporte transmembrana protón dependiente también contribuyó al desarrollo de su resistencia a norfloxacina ya que la presencia del CCCP aumentó en todos ellos el nivel de acumulación de dicha fluoroquinolona. Este efecto fue especialmente notable en doce de las cepas mutantes (1N, 1L, 2L, 4L, 5N, 5L, 6L, 8N, 9N, 9L, 10N) en las que la presencia de CCCP resultó en un nivel de acumulación de norfloxacina 2-6 veces superior.

En dos de las cepas mutantes (3N, 3L) no se demostró la presencia de un transporte transmembrana protón dependiente de norfloxacina dado el nulo efecto del CCCP en sus respectivos niveles de acumulación de norfloxacina, sin embargo no puede descartarse la presencia de otro tipo de bombas de expulsión activa no protón dependiente que pudieran determinar su bajo nivel de acumulación tanto en ellas como en su cepa origen 3P. En este sentido, además de los sistemas de transporte transmembrana protón dependientes, se han descrito transportadores dependientes de ATPasas [301, 370].

Por su parte, también las cepas 1C ,7C y 11C mostraron un fenotipo de múltiple resistencia a antimicrobianos, incluyendo no sólo β-lactámicos sino también a quinolonas, tetraciclina, acriflavina y CCCP, todos ellos identificados como sustratos de sistemas de expulsión activa en *E. coli* '[83, 84, 317, 327].

Los transportadores transmembrana protóndependientes generalmente actúan como mecanismos complementarios en el desarrollo de resistencia a antimicrobianos. Estos sistemas suelen transportar diferentes sustra-

tos y en muchas ocasiones antimicrobianos de diferente tipo, tal es el caso de AcrAB de *E. coli* (incluyendo quinolonas, β-lactámicos, cloranfenicol, rifampicina, acriflavina) [292, 293, 357, 364]. Además es característica en los mutantes con fenotipos de resistencia múltiple a antibióticos, la expresión de bombas de expulsión activa; tal es el caso de los mutantes Mar de *E. coli*. Estos mutantes son resistentes a fluoroquinolonas merced a una deficiente permeabilidad de su membrana externa por la falta de la porina F, sumado a un incremento de la expulsión activa [8, 96], y no es difícil encontrarlos en aislamientos clínicos [298], así como entre mutantes resistentes desarrollados *in vitro* [96, 196]. Asimismo, el fenotipo Mar está ligado a la hiperexpresión del operón *acrAB* [8, 357]. También se ha evidenciado la presencia de sistemas de expulsión activa en otras especies de enterobacterias asociados a la expresión de fenotipos de resistencia múltiple y a la expresión de homólogos de *marA* (el activador del operón *marAB*) [8, 164, 258, 259, 269, 269, 301]. En este trabajo de tesis, todos los mutantes desarrollados tanto de *E. coli* como de otras especies, presentaron fenotipos de resistencia múltiple a quinolonas, β-lactámicos y otros antimicrobianos ensayados, por lo que es posible que en todos ellos se esté manifestando la expresión de *marA* así como de genes homólogos de este activador en las cepas mutantes seleccionadas de otras especies de enterobacterias.

11.6 - INFLUENCIA DE LAS MUTACIONES EN LA ADN GIRASA Y TOPOISOMERASA IV EN EL DESARROLLO DE RESISTENCIA A QUINOLONAS EN *E. COLI*

El análisis de los cambios operados en las secuencias de aminoácidos de las subunidades de topoisomerasas reveló que la sustitución de Ser-83 por Leu en la subunidad GyrA de la ADN-girasa fue la mutación más frecuentemente identificada, lo que coincide con los resultados de otros autores [135, 187, 196, 359, 385, 472]. Las catorce cepas resistentes a las quinolonas y las cepas origen 1P, 5P y 7P con dicha mutación, mostraron un alto nivel de resistencia al ácido nalidíxico (CMI ≥ 128 mg/l), así como a la ciprofloxacina y norfloxacina (CMIs ≥ 0,25 mg/l), coincidiendo con trabajos anteriores [135, 472].

Por su parte, la sustitución de la Ser-83 por Ala en la ADN-girasa se asoció a una menor CMI del ácido nalidíxico y fluoroquinolonas que la sustitución de la Ser83 por Leu. Es posible que esta sustitución aminoacídica, a pesar de estar localizada en la región del gen *gyrA* determinante de resistencia a quinolonas, no conduzca al mismo nivel de resistencia que la sustitución de Ser83 por Leu. Aunque la cepa 10P sí presentó un mayor nivel de resistencia a las quinolonas ensayadas que el resto de las seis cepas origen que no mostraron ninguna mutación en las topoisomerasas [187]. Asimismo, la cepa 10L mostró una mutación que resulta de la sustitución de Ala-83 por Val, aunque la cepa 10P ya presentara una sustitución de la Ser-83 por Ala, descrita en un trabajo previo [187]. La presencia de esta nueva mutación en la cepa 10L se asoció a un mayor nivel de resistencia a fluoroquinolonas que la presencia de la mutación Ser83 por Ala en su cepa origen, no obstante la implicación del transporte transmembrana protón dependiente de fluoroquinolonas en la cepa 10L, que quedó demostrada en el apartado de resultados sobre los ensayos de acumulación de esta tesis, también contribuyó al nivel de resistencia observado en ella a las quinolonas.

Por otra parte, el mismo fenotipo en la ADN girasa y topoisomerasa IV tanto en la cepa 10N como en la cepa 10L, con respecto a su cepa origen en la región determinante de resistencia a quinolonas de la ADN girasa, no supuso el mismo nivel de resistencia a quinolonas en ambos mutantes. Por lo que el mayor nivel de resistencia a quinolonas observado en la cepa 10N con respecto a la cepa 10P pudo deberse también a un transporte transmembrana protón dependiente incrementado (demostrado previamente para la norfloxacina en el capítulo de resultados). En este contexto, la importancia de los sistemas de expulsión activa en el desarrollo de resistencia a fluoroquinolonas en *E. coli* se ha vinculado a la expresión de sistemas como AcrAB, entre otros [345, 346, 357, 370]. Otro tipo de mutación en GyrA fue la expresada en las cepas 6N y 6L (Asp87 → Asn) que también resultó en un importante incremento de resistencia a quinolonas, tal como otros autores han descrito [359]. En este sentido, se ha descrito la combinación de mutaciones en *gyrA* y *parC* en cepas de *E. coli* con una hiperexpresión de *marA* asociados a un alto nivel de resistencia a fluoroquinolonas [355]. Asimismo, la presencia de una segunda mutación (Ser80 → Arg) en la secuencia aminocídica de ParC en la cepa 5N no estuvo asociada con una mayor CMI de norfloxacina

que la observada en la cepa 5L.

Por otro lado, la ausencia de cambios en las subunidades GyrB y ParE corroboran los resultados de trabajos anteriores [301, 472], que muestran que las mutaciones en los genes *gyrB* y *parE* no juegan un papel importante en la adquisición de resistencia a quinolonas, aunque otros estudios [57, 135] sí atribuyan un papel más importante en la resistencia a quinolonas a las mutaciones en dichos genes *gyrB* y *parE*.

11.7 - CLASIFICACIÓN DE LOS MUTANTES

Según el papel de expresión de la OmpF y el transporte activo protón-dependiente en el desarrollo de resistencia a quinolonas, los mutantes en este estudio han sido clasificados en cinco grupos diferentes:

Primer Grupo — Formado por las cepas 1N, 2N, 2L, 4L, 5N, 5L, 8N y 9L. En este grupo la falta de OmpF fue asociada con una disminución de la acumulación de norfloxacina, presentando además una expulsión activa incrementada de la mencionada quinolona, todo lo que pudo contribuir al aumento de la resistencia a norfloxacina y a otras quinolonas, en estos ocho mutantes, con respecto a sus cepas origen. Asimismo, el efecto de la segunda mutación (en ParC), en cuanto al nivel de resistencia a norfloxacina en la cepa 5N, puede haber sido equilibrado por la mayor acumulación de esta fluoroquinolona en la cepa 5N que en la cepa 5L [135, 196, 326, 472].

Segundo Grupo — Formado por las cepas 6N, 6L y 9N. En este grupo la pérdida de la porina OmpF no está asociada con la disminución de la acumulación de norfloxacina, como ocurre en el grupo anterior. La disminución de la acumulación de norfloxacina debido al incremento de la expulsión activa, sumado a la presencia de la mutación en la ADN-girasa, serían los responsables del incremento del nivel de resistencia a fluoroquinolonas en los mutantes de este grupo con respecto a sus cepas origen. La presencia de ambos mecanismos en las cepas 6N y 6L, que presentaron el mismo cambio (Asp-87 por Asn) en la subunidad GyrA que la cepa de *E. coli* N113 descrita por Oram y cols. [359], podría explicar que las CMIs de las quinolonas ensayadas sean más altas en las cepas 6L y 6N que las descritas previamente en la cepa N113 [359].

Tercer Grupo — Este grupo constituido por las cepas 3N, 3L y 10N se caracterizó por la pérdida de expresión de la porina F. Sin embargo, esta pérdida de expresión, no estuvo asociada con una disminución significativa de la acumulación de norfloxacina que alcanzó un nivel similar al de las respectivas cepas origen. Asimismo, la presencia de CCCP no resultó en un incremento de dicha acumulación en las cepas 3N y 3L, por lo que la mutación en la subunidad A de la ADN girasa observada en las cepas 3N y 3L debió ser determinante para el incremento de resistencia de estos dos mutantes a las quinolonas ensayadas. Aunque no debió ser el único mecanismo implicado, ya que mutaciones únicas similares a las encontradas en las cepas 3N y 3L se han asociado en estudios previos [135, 385, 472] a CMIs de ciprofloxacina no superiores a 0,25 mg/l, frente a los 4-8 mg/l en estos dos mutantes. Sin embargo, sí se constató una acumulación de norfloxacina en la cepa origen 3P, muy inferior a la usualmente detectada en cepas sensibles de *E. coli*, tal como *E. coli* KL16 [204]. Este defecto acumulativo no parece ser debido a un incremento del transporte transmembrana dependiente de protones (ya que un inhibidor de este tipo de transportadores no modificó el nivel de norfloxacina acumulada en 3P, 3N o 3L) [135, 370], aunque no se puede excluir la implicación de algún sistema transportador no dependiente de protones [370]. Por tanto, a la vista de los resultados, el nivel de resistencia alcanzado en los mutantes 3N y 3L

sería debido a la mutación en la ADN girasa cuyo efecto fue multiplicado por el bajo nivel de acumulación que ya habían heredado estos mutantes de su respectiva cepa origen [135, 385].

En cuanto a la cepa 10N que sí se mostró sensible al efecto del CCCP en su capacidad de acumular norfloxacina, tanto la presencia de una incrementada expulsión activa protón-dependiente de quinolonas, como la mutación en el gen *gyrA* y la defectuosa acumulación de norfloxacina heredada de la cepa 10P, fueron los factores determinantes de su nivel de resistencia a quinolonas.

Cuarto Grupo — Formado por la cepa 4N. La acumulación disminuida de norfloxacina que se demostró en la cepa origen 4P con respecto a la cepa sensible KL16, pudo conducir a un alto nivel de resistencia a fluoroquinolonas, cuando se combinó con una sustitución Ser-83 por Leu, en la subunidad GyrA en la cepa 4N.

Quinto Grupo — Formado por las cepas 1L, 7L y 10L. En este grupo el incremento de la CMI a la norfloxacina (4-32 veces), con respecto a las cepas origen 1P, 7P y 10P, parece estar determinado por la presencia de una acumulación disminuida de fluoroquinolonas. La adición de 50 ó 100 μM de CCCP produjo un incremento de acumulación de norfloxacina de 62% al 80% en las cepas 1L y 10L y del 17% en la cepa 7L. Estos resultados coinciden con mayores CMIs de norfloxacina en las cepas 1L y 10L que en la cepa 7L con respecto a sus cepas origen.

Hay que añadir además que todo este grupo de mutantes presentó un incremento de la resistencia a tetraciclina y/o a cefalotina concomitantemente con un aumento de la CMI del ácido nalidíxico. Estos agentes antimicrobianos han sido descritos como sustratos del sistema de reflujo AcrAB en *E. coli* [357, 370], por lo que la sobreexpresión del sistema AcrAB podría explicar la multirresistencia mostrada por las cepas 1L, 7L y 10L.

Cepas control y grupos de mutantes	OmpF[a]	Acumulación de norfloxacina en las cepas control y cepas origen de *E. coli* en µg/g de peso seco celular $\bar{x}$[b] // $\bar{x}$+[c]	Acumulación de norfloxacina en los mutantes de *E. coli* en µg/g de peso seco celular $\bar{x}$[b] // $\bar{x}$+[c]
KL16 JF703	$OmpF^+$ $OmpF^-$	211 ± 0 // 211 ± 0 143 ± 9 // 143 ± 9	— —
1er grupo: 1N, 2N, 2L, 4L, 5N[d], 5L, 8N, 9L	$OmpF^-$	1P: 74 ± 4 // 108 ± 0 2P: 96 ± 6 // 99 ± 8 4P: 24 ± 2 // 27 ± 4 5P: 147 ± 4 // 199±6 8P: 40 ± 4 // 52 ± 3 9P: 85 ± 4 // 108 ± 0	1N: 57 ± 2 // 133 ± 5 2N: 30 ± 1 // 88 ± 1 2L: 61 ± 4 // 127 ± 2 4L: 13 ± 2 // 33 ± 6 5N: 38 ± 2 // 231 ± 10 5L: 24 ± 1 // 87 ± 5 8N: 30 ± 1 // 178 ± 0 9L: 27 ± 0 // 92 ± 0
2° grupo: 6N, 6L, 9N	$OmpF^+$	6P: 143 ± 12 // 205 ± 11 9P: 85 ± 4 // 108 ± 0	6N: 103 ± 9 // 203 ± 9 6L: 72 ± 5 // 180 ± 13 9N: 20 ± 1 // 40 ± 0
3er grupo: 3N, 3L, 10N[d]	$OmpF^-$	3P: 24 ± 1 // 26 ± 2 10P: 88 ± 16 // 171 ± 1	3N: 25 ± 1 // 25 ± 2 3L: 23 ± 3 // 27 ± 1 10N: 84 ±11 // 198 ± 19
4° grupo: 4N	$OmpF^+$	4P: 24 ± 2 // 27 ± 4	4N: 36 ± 3 // 31 ± 1
5° grupo: 1L, 7L, 10L	$OmpF^+$	1P: 74 ± 4 // 108 ± 0 7P: 158 ± 2 // 205 ± 12 10P: 88 ± 16 // 171 ± 1	1L: 75 ± 4 // 135 ± 0 7L:199 ± 12 // 233 ± 14 10L: 81 ± 9 // 131 ± 1

[a] $OmpF^+$ = expresión de la porina F, $OmpF^-$ = déficit de la porina F.

[b] $\bar{x}$ = Media de los niveles de norfloxacina acumulados según medidas realizadas a los 5, 15 y 30 minutos.

[c] $\bar{x}$+ = Media de los niveles de norfloxacina acumulados según medidas realizadas a los 5, 15 y 30 minutos en presencia de 50 µM de CCCP (carbonil-cianuro de *m*-clorofenilhidrazona).

[d] Cepas con fenotipo similar al de los mutantes NorC (LPS rugoso y $OmpF^-$).

11.8 - CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE PORINAS EN *ENTEROBACTER*, *CITROBACTER*, *KLEBSIELLA*, *PROTEUS* Y *SALMONELLA* TRAS SELECCIÓN CON NORFLOXACINA Y LOMEFLOXACINA

Los mutantes seleccionados de las cepas origen 12P, 13P, 14P, 15P, 16P, 17P y 18P mostraron una resistencia aumentada a quinolonas, β-lactámicos y tetraciclina. El desarrollo del fenotipo de múltiple resistencia a antibióticos en mutantes Mar en *E. coli* se ha asociado frecuentemente a la reducción de OmpF [8]. Los mutantes Mar desarrollan resistencia a fluoroquinolonas debido a la disminución de permeabilidad por el efecto combinado de dos mecanismos: la falta de expresión de OmpF y la presencia de sistema/s de expulsión activa [8, 89, 96, 97, 180, 221, 321]. Igualmente, otros homólogos de *mar* se han identificado en *Salmonella typhimurium* [8], *Klebsiella pneumoniae* [8, 164], *Proteus vulgaris* [8, 232] y *Enterobacter cloacae* [8, 258, 259, 269, 269, 387]. Asimismo, estudios previos describen el desarrollo de mutantes Mar en *E. coli* y otras enterobacterias después de la selección con norfloxacina o ciprofloxacina [96]. No obstante, la pérdida de expresión de la porina F en mutantes de *E. coli* como la de porinas con similar función en las cepas de *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* y *Salmonella enteritidis* fue más frecuente en mutantes seleccionados con norfloxacina que con lomefloxacina. En este sentido, todos los mutantes obtenidos como resultado del uso de la norfloxacina como agente selectivo en las cepas de *E. cloacae* y *K. pneumoniae* (las cepas 14N y 16N) no expresaron la porina F.

Tanto la **cepa *Citrobacter diversus* 12N como la cepa *Citrobacter freundii* 13N** mostraron una disminuida expresión de sendas proteínas de la membrana externa , de 47 KDa de peso molecular aparente en geles de poliacrilamida con urea (42 kDa en geles de poliacrilamida sin urea), que en la cepa 13N se asoció a un menor nivel de norfloxacina pero no en la cepa 12N. Coincidiendo con estos resultados, hay descripciones previas de mutantes de la especie *C. freundii* resistentes a quinolonas con pérdida de una proteína de membrana externa (PME) similar a la identificada como ausente en la cepa 13N, y que también se asoció a menor acumulación de norfloxacina al igual que en la cepa 13N [18]. También la pérdida de una PME similar se ha asociado al desarrollo de resistencia a β-lactámicos en aislamientos clínicos de *C. freundii* [294].

Por otra parte, los mutantes de ***Enterobacter cloacae* 14N y 14L** presentaron una notable pérdida de expresión de una proteína de 37-38 kDa (de peso molecular aparente en geles de poliacrilamida sin urea) respecto de su cepa origen 14P. La falta de expresión de esta proteína, de movilidad electroforética similar a la OmpF descrita en trabajos previos sobre *E. cloacae*, pudo contribuir a la disminución de acumulación de norfloxacina observada en las cepas 14N y 14L respecto de la cepa 14P, tal como han descrito otros autores [168, 290]. Este hecho, junto al efecto del CCCP en el nivel de la norfloxacina acumulada tanto en 14N como 14L, demuestra un papel importante de los mecanismos de transporte transmembrana protón-dependientes en la resistencia a quinolonas en ambas cepas [8, 168, 290, 296]. La pérdida de expresión de la porina F ha sido frecuentemente vinculada al desarrollo de resistencia a quinolonas [168, 290, 387] y también a carbapenemas y otros antibióticos β-lactámicos en *E. cloacae* [398]. Asimismo, al igual que en *E. coli* la porina C, la porina D de *E. cloacae* parece jugar un papel menos importante en la difusión de antibióticos

β-lactámicos en la célula de *E. cloacae* [99, 109, 269, 398, 484]. De igual manera, la pérdida de expresión de la porina F en las cepas 14N y 14L, también pudo contribuir a incrementar sus niveles de resistencia a los antibióticos β-lactámicos ensayados como ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona y ceftizoxima a los que la cepa origen era sensible, así como a la cefalotina y cefoxitina, tal como se ha descrito en previos trabajos para cepas de *E. cloacae* deficientes en porina F [99, 109, 269, 398, 484].

Asimismo, la cepa 14N tampoco expresó otra proteína mayor de la membrana externa de 39-40 kDa (peso molecular aparente en geles de poliacrilamida sin urea) que sí expresó la cepa origen y también la cepa mutante 14L. La deficiencia de esta proteína quizás también pudo contribuir a determinar las CMIs de los diferentes antibióticos β-lactámicos en esta cepa. En este sentido se ha descrito que la porina D, de 40 kDa [340], de *E. cloacae* podría tener algún papel en la difusión de antibióticos β-lactámicos, aunque de menor importancia que la porina F [99, 109, 269, 398, 484].

De igual forma, en ambos mutantes, el incremento de resistencia a cefalosporinas fue concomitante con el incremento de la CMI de tetraciclina; antimicrobiano que es sustrato común de diferentes sistemas de expulsión activa identificados en bacterias gramnegativas [346, 370], por lo que no se puede excluir la participación de algún sistema de expulsión activa en la susceptibilidad disminuida a β-lactámicos en ambos mutantes. El posible efecto de estos sistemas de transporte transmembrana sumado al déficit de porina F en ambos mutantes 14N y 14L favorecería la acción de las β-lactamasas presentes en estas cepas en la hidrólisis e inactivación de moléculas de antibióticos β-lactámicos [4, 84, 345, 398].

Asimismo, la cepa 14L, a diferencia de las cepas 14P y 14N, incrementó la expresión de una proteína de 40-41 kDa (en geles de poliacrilamida sin urea) que podría corresponder a la descrita como PhoE en *E. cloacae* [39, 249].

Por su parte, la cepa origen de ***Enterobacter cloacae* 15P**, aunque sensible al ácido nalidíxico y a las fluoroquinolonas ensayadas, es resistente a cefalosporinas de tercera generación (las CMIs de las diferentes cefalosporinas ensayadas fue ≥ 32 mg/l) pero igual de sensible a imipenem que la cepa 14P. El perfil de susceptibilidad observado en la cepa 15P es coincidente con el descrito en otras cepas de la misma especie hiperproductoras de β-lactamasas de la Clase C (también llamadas del tipo AmpC) [99]. En este sentido, se ha descrito en un reciente estudio que durante el tratamiento con antibióticos β-lactámicos la resistencia debida a la producción desreprimida de β-lactamasas clase C aparece en el 10 al 50% de los pacientes infectados por *C. freundii*, *E. cloacae*, *Serratia marcescens* y *Pseudomonas aeruginosa* [5, 285, 501]. Asimismo, se ha demostrado reiteradamente que la hiperproducción de β-lactamasas de clase C es frecuente en el género *Enterobacter* [178, 327, 463].

Del desarrollo de mutantes resistentes a quinolonas a partir de la cepa 15P resultó que la cepa seleccionada con norfloxacina (15N) no expresó una proteína de 37-38 kDa (peso molecular aparente en geles de poliacrilamida sin urea), que sin embargo, sí mostró la cepa origen (15P), así como la cepa 15L. Por su parte, la cepa 15L sí expresó esta proteína de 37-38 kDa (47 kDa en geles de poliacrilamida con urea) aunque en un grado mucho menor de lo que fue expresada en la cepa origen 15P. Al igual que en la cepa origen 14P de la misma especie, esta proteína de 37-38 kDa probablemente se corresponda con la porina F de *E. cloacae*. De esta forma, su ausencia en la cepa 15N, o bien su disminuida expresión en la cepa 15L, debió contribuir decisivamente a dificultar la penetración tanto de fluoroquinolonas como de antibióti-

cos β-lactámicos en las células de dichos mutantes, tal como se ha descrito previamente en las cepas de *E. cloacae* resistentes a dichos antimicrobianos [258, 259]. Asimismo, tanto la cepa 15N como la cepa 15L mostraron una disminuida expresión de una proteína de 39-40 kDa (peso molecular aparente en geles de poliacrilamida sin urea) que quizás podría corresponder a la porina D de *E. cloacae*, a juzgar por su movilidad electroforética. En cualquier caso, es la porina F la que con su expresión o deficiencia define la mayor o menor permeabilidad de la membrana externa de las cepas de *E. cloacae* a antimicrobianos como las fluorquinolonas, tal como se desprende de trabajos previos [258, 259]. En este sentido, la resistencia desarrollada por ambos mutantes (15N y 15L) a quinolonas también se asoció a la presencia de un menor nivel de norfloxacina acumulada con respecto a la cepa origen. Este nivel se multiplicó por dos cuando los ensayos de acumulación se realizaron en presencia de CCCP, indicando una participación importante de las bombas de expulsión activas en el nivel de acumulación de fluoroquinolonas por ambos mutantes, tal como se ha descrito en estudios previos [296, 370]. Las CMIs de las fluoroquinolonas fueron en algunos casos del doble en la cepa 15N respecto del mutante 15L, lo que pudo estar determinado por el déficit total de OmpF que mostró el mutante 15N. En cualquier caso, no se descarta la probable presencia de mutaciones en las subunidades de la ADN girasa bacteriana tal como es frecuente encontrar en el caso de altos niveles de resistencia a fluoroquinolonas en cepas del género *Enterobacter* [483]. Asimismo, la falta de expresión de la proteína de 37-38 kDa en la cepa 15N pudo influir en multiplicar por dos la CMI del imipenem en esta cepa respecto de su cepa origen (15P) o del mutante 15L (0,25 mg/l frente a 0,12 mg/l). Sin embargo, la cepa 15N a pesar de ser totalmente deficiente en la porina F no fue más resistente que su cepa origen 15P o que el mutante 15L a las cefalosporinas ensayadas (con la excepción de la cefalotina o la cefoxitina). Por lo que parece que el papel de la porina F y, por tanto, de la permeabilidad de la pared en la resistencia a antibióticos β-lactámicos es complementaria y no principal [345].

Tampoco la **cepa 16N de la especie *Klebsiella pneumoniae*** expresó la porina OmpK36. La pérdida de esta porina, con un papel similar a la de la OmpF en *E. coli*, contribuyó a aumentar las CMIs de cefoxitina, imipenem, tetraciclina y cloranfenicol en este mutante [8, 305, 306, 385]. La falta de expresión de OmpK36 justifica que la cepa 16N acumulara menos norfloxacina que la cepa 16L, aunque ambas acumularon aún menos del 50% de lo que acumuló la cepa origen 16P y también, en ambos casos, en presencia de 50 y 100 μM de CCCP, la acumulación de norfloxacina fue como mínimo del doble que sin presencia de este inhibidor del transporte transmembrana protón-dependiente. Con lo que la permeabilidad y el transporte protón dependiente en 16N o sólo el transporte protón dependiente en la cepa 16L, fueron dos mecanismos involucrados en el desarrollo de resistencia a norfloxacina (y a otras quinolonas) en estas cepas, al igual que se ha descrito en otros trabajos sobre resistencia a quinolonas en cepas de *Klebsiella pneumoniae* [305, 306]. Por su parte, el efecto de 100 μM CCCP en la cepa origen 16P resultó en un incremento del nivel de norfloxacina en 1,4 veces, lo que fue netamente inferior al efecto del mencionado inhibidor en las cepas 16N y 16L, en las que tanto 50 como 100 μM de CCCP dieron lugar a un nivel de norfloxacina tres veces superior. Al igual que ocurrió en las cepas mutantes de *E. coli* seleccionadas con lomefloxacina, que no fueron deficientes en porina F, o en las cepas mutante 14L y 15L, la cepa 16L mostró un nivel de resistencia a cefalosporinas y tetraciclina similar a la cepa 16N, a pesar de que su perfil electroforético fue

igual al de la cepa origen 16P, indicando de nuevo la existencia de otro tipo de mecanismo, quizás bombas de expulsión activa [8, 345, 346] que favorecen el desarrollo del fenotipo de múltiple resistencia.

Por otra parte, **la cepa *Salmonella enteritidis* 18L** al igual que la cepa *Citrobacter freundii* **13L** y la cepa *Klebsiella pneumoniae* **16L** mostraron el mismo perfil electroforético que sus respectivas cepas origen, a pesar de ser notablemente más resistentes a quinolonas. Estos cuatro mutantes "L", que no perdieron la expresión de la OmpF, también mostraron un nivel aumentado de resistencia a β-lactámicos y a tetraciclinas concomitantemente con quinolonas, mostrando que la expulsión activa probablemente puede estar contribuyendo a disminuir su susceptibilidad a β-lactámicos, así como a las quinolonas, en estas cepas de diferente especie [8, 168, 290, 305, 345, 346, 370, 386, 414, 483]. En este sentido, las cepas 13L y 16L acumularon menos norfloxacina que las respectivas cepas origen y en presencia de 50 o 100 μM de CCCP este nivel se incrementó alcanzando o superando los niveles de sus cepas origen. Sin embargo, estudios previos han demostrado el papel principal de las mutaciones en la ADN-girasa en el desarrollo de resistencia a quinolonas en enterobacterias [18, 63, 115, 120, 168, 181, 290, 384, 385, 386, 387, 414, 483], dejando a las porinas y a la expulsión activa una función complementaria. Por su parte, la cepa 18L, a pesar de ser notablemente más resistente a quinolonas que la cepa 18P, no mostró cambios en el perfil electroforético de sus proteínas de membrana externa, ni tampoco una menor acumulación que la cepa origen, por lo que probablemente sólo las mutaciones en las topoisomerasas pudieron determinar el incremento de resistencia observado en este mutante respecto de su cepa origen. Asimismo, no se puede excluir la posibilidad de que, además de una activa expulsión de quinolonas en las cepas 13L y 16L (demostrada con los ensayos de acumulación en presencia del CCCP) así como en las cepas 12N, 13N, 14N, 14L, 15L, 16N y 18L, existan mutaciones concomitantes en las topoisomerasas, tal como se describe en trabajos previos para mutantes de estas especies como *E. cloacae* [118, 483], *K. pneumoniae* [118, 483], *C. diversus* y *C. freundii* [18, 483], *Proteus vulgaris* y *Salmonella enteritidis* [63, 181, 182, 384, 386, 414].

11.8.1 - COMPARACIÓN DEL EFECTO DE LA LOMEFLOXACINA EN LA SELECCIÓN DE MUTANTES RESISTENTES EN LAS DIFERENTES ESPECIES DE ENTEROBACTERIAS

El efecto de la lomefloxacina en la selección de mutantes en *E. coli* tuvo efectos paralelos en lo que a proteínas de la membrana externa se refiere. Sólo cinco de los dieciocho mutantes de *E. coli* seleccionados con la lomefloxacina mostraron la falta de la porina F, mientras que todos los seleccionados con la norfloxacina sí mostraron la pérdida de dicha porina. Este diferente efecto de la lomefloxacina y norfloxacina en la selección de mutantes, tanto de cepas de *E. coli* como de otras especies de enterobacterias, está demostrando que la presencia o ausencia de la porina F no parece ser tan determinativa en el desarrollo de resistencia cruzada, al menos en estas especies de enterobacterias. Asimismo, el desarrollo de resistencia múltiple a antibióticos no parecer tener el mismo origen en unos que en otros mutantes, ya que los mutantes "L", tanto de cepas de *E. coli* como de otras enterobacterias, no mostraron siempre el mismo fenotipo, en lo que a proteínas de membrana externa se refiere, que los mutantes "N" y tampoco que los mutantes Mar descritos en *E. coli* y otras enterobacterias [8, 89, 96, 97, 164, 180, 221, 258, 259, 269, 321, 385].

Sin embargo, **el efecto selectivo de la lomefloxacina en la cepa 17P de la especie *Proteus vulgaris*** sí produjo cambios en la expresión de las proteínas de membrana externa. En concreto disminuyó la expresión de una porina de 37 kDa de peso molecular aparente en geles de poliacrilamida sin urea, y ocasionó un incremento simultáneo de una de 40 kDa (45 y 48 kDa respectivamente en geles de poliacrilamida con urea), tal como se ha descrito en trabajos previos para otras cepas resistentes a β-lactámicos y quinolonas en esta misma especie bacteriana [233, 261, 323, 473, 500]. Aunque este cambio no afectó al nivel de acumulación de norfloxacina que no fue diferente en el mutante 17L respecto de la cepa origen. Sin embargo, tanto en la cepa origen como en el mutante 17L, la presencia de CCCP resultó en un ligero incremento en la acumulación de norfloxacina (1,2 al 1,9%). La presencia de este transporte transmembrana protón-dependiente tanto en la cepa origen como en el mutante no fue, por lo tanto, la causa del mayor nivel de resistencia a fluoroquinolonas en la cepa 17L. Por ello, es probable que la existencia de mutaciones en las topoisomerasas bacterianas estén determinando el perfil de resistencia a quinolonas observado en la cepa 17L. En cualquier caso, lo que sí parece evidente es la existencia de múltiples mutaciones en genes cromosómicos asociados al desarrollo del fenotipo de resistencia múltiple en la cepa 17L. En este contexto, la activación del gen homólogo de *marA* [8, 232] ha sido descrita en un aislamiento clínico de *Proteus vulgaris* asociado a la pérdida de expresión de la porina F cuando el gen *pqrA* es clonado en una cepa sensible de *E. coli* [232]. Asimismo, la cepa 17L también se mostró más resistente que su cepa origen a otros antimicrobianos como cefalosporinas, gentamicina y cloranfenicol que su cepa origen. Es posible que el fenotipo de múltiple resistencia a diferentes antimicrobianos en la cepa 17L se deba a la expresión del gen *pqrA* u otro gen homólogo a *marA* de *E. coli* que pueda haber resultado activado con el desarrollo de este mutante [232]. Tampoco puede descartarse que la expresión de tal fenotipo de múltiple resistencia se deba en parte a la activación de sistemas de expulsión activa tal como ya ha sido descrito en un trabajo previo sobre *Proteus vulgaris*, así como al déficit de expresión de la proteína de membrana externa 17L hallada en este trabajo de tesis. En este sentido, la pérdida de la porina de 37 KDa en cepas de *Proteus vulgaris* se ha asociado al incremento de resistencia a β-lactámicos, tales como cefoxitina, cefalotina e imipenem entre otros, que se aprecia en dicho mutante [233, 323]. Tampoco es descartable la presencia concomitante de mutaciones en las topoisomerasas tal como se ha descrito previamente en cepas de *P. vulgaris* con un alto nivel de resistencia a fluoroquinolonas [355].

Finalmente, tanto las cepas origen como las mutantes de *Enterobacter cloacae* (14 y 15), *Klebsiella pneumoniae* (16), *Citrobacter diversus* (12) y *Proteus vulgaris* (17) mostraron un fenotipo del LPS de la membrana externa liso, a excepción de la cepa origen 14P y del mutante 15L en los que no se detectó la presencia de componentes de alto peso molecular en el perfil electroforético de su LPS. En este contexto, la pérdida de expresión de los componentes de alto peso molecular del LPS tras el desarrollo de mutantes resistentes ha sido frecuentemente descrito en *E coli*, tal es el caso de los mutantes NorC [135, 326]. De igual forma, también es frecuente la aparición de múltiples mutaciones cromosómicas en mutantes con fenotipo de múltiple resistencia a antimicrobianos [135, 355].

Por su parte, en las cepas origen de *C. freundii* 13P y *Salmonella enteritidis* 18P no se detectó la presencia de componentes de alto peso molecular, presentado por tanto un fenotipo rugoso al igual que los mutantes

derivados de ellas. Tampoco en los mutantes de *E. coli* estudiados en esta tesis fue frecuente la presencia de cambios en el LPS asociados al desarrollo de resistencia (sólo tres mutantes presentaron un LPS diferente de sus cepas origen: dos presentaban un fenotipo de LPS rugoso y el tercero liso), presentando un fenotipo liso en su lipopolisacárido 16 de los 18 mutantes de *E. coli* resistentes a quinolonas estudiados.

11.9 - FILAMENTACIÓN Y SELECCIÓN CON CAZ

La resistencia a fluoroquinolonas y β-lactámicos, en mutantes de *Escherichia coli* con resistencia múltiple a antibióticos, se asocia con una expresión reducida de la OmpF y con la sobreexpresión de sistemas de expulsión activa de drogas [96]. Por otro lado, se conoce la influencia de quinolonas en la expresión de genes diferentes como los involucrados en la síntesis de los precursores del peptidoglucano y en la división celular (ej.: *ftsZ*) [474], lo que conduce a la filamentación o a cambios en la composición de la pared celular [167, 474].

Al comparar los fenotipos de multirresistencia desarrollados por mutantes seleccionados con fluoroquinolonas y los mutantes seleccionados con ceftazidima, se observó la existencia de puntos comunes en esos fenotipos que fueron estudiados con más detalle en tres mutantes: 7L, 7C y 11C. El estudio morfológico mediante microscopía óptica y tinción de Gram reveló que estos tres mutantes mostraron filamentación respecto de sus cepas origen. La presencia de filamentación como consecuencia de la exposición a β-lactámicos y a quinolonas ha sido descrita previamente [167]. No obstante, las cepas 7L, 7C y 11C de este estudio mantuvieron su morfología filamentosa sin la presencia de quinolona o ceftazidima, respectivamente, en el medio de cultivo. Las CMIs de las cefalosporinas ensayadas y del meropenem aumentaron en las cepas 7C y 11C en los siguientes rangos: 16 veces la de cefoxitina, 512 y 128 veces respectivamente la de ceftazidima, 32 y 16 veces la de cefotaxima, y 2 a 4 veces la de meropenem. Concomitantemente, las cepas 7C y 11C no expresaron la porina F al igual que la cepa control JF703. En este contexto, la falta de la porina F en cepas de *E. coli* puede explicar un incremento sólo de 4-8 veces en las CMIs de cefoxitina, ceftazidima y cefotaxima, como se ha descrito previamente [167]. Del mismo modo, aunque la cepa 7L no perdió la expresión de la porina F, las CMIs de cefoxitina, ceftazidima y cefotaxima aumentaron de 8-16 veces en esta última cepa con respecto a su cepa origen.

Se ha descrito que, en las cepas de *E. coli*, la ceftazidima muestra la afinidad más alta por las PBP-3 (proteínas de unión a penicilinas tipo 3) [329], así como la baja influencia de la expresión de la porina OmpF en el aumento de la CMI del meropenem [329]. Es más, la inhibición de la PBP-3 produce filamentación de la célula, por lo que no pueden excluirse la presencia de posibles cambios en la expresión de las PBPs tras el efecto de la presión selectiva de la ceftazidima o lomefloxacina en las cepas estudiadas. En este contexto, un trabajo anterior describió varios cambios en el peptidoglicano de *E. coli* al estar bajo el efecto de la pefloxacina y ofloxacina [474]. Además, el pequeño incremento (menos de 1,65 veces) en la actividad hidrolítica β-lactamásica de los extractos periplásmicos de las cepas 7L, 7C y 11C frente a la cefaloridina o bencilpenicilina con respecto a sus cepas origen no fue suficiente para explicar el incremento de resistencia a la cefalosporina en estos tres mutantes [239].

En mutantes de *E. coli* con resistencia múltiple a antimicrobianos se ha descrito el papel de los sistemas de expulsión activa en el desarrollo de resistencia a varios agentes antimicrobianos [96]. Sin embargo, la presencia de 50 μM de CCCP (un inhibidor del gradiente protónico transmembrana) no se asoció a los cambios en sus niveles de resistencia a β-lactámicos en ninguno de los tres

mutantes estudiados.

La resistencia aumentada a β-lactámicos tanto en los mutantes seleccionados con lomefloxacina como con ceftazidima, la aparición asociada de la filamentación, el papel de la expresión de la porina F, la comparación de la actividad hidrolítica de β-lactamasas entre los mencionados mutantes y el efecto del CCCP en las CMIs de los β-lactámicos sugieren un solapamiento en el desarrollo de resistencia a los β-lactámicos y quinolonas en la cepa 7L [474, 492].

11.10 - VENTAJAS DEL USO DE 0,5% DE SDS EN LOS GELES DE POLIACRILAMIDA PARA SEPARACIÓN DEL LPS DE ENTEROBACTERIAS

La electroforesis en geles de poliacrilamida has sido extensivamente usada para el estudio del lipopolisacárido de la membrana externa [205, 326]. La frecuente agregación de los polímeros de alto peso molecular, en los extractos de LPS, hace difícil la caracterización de posibles cambios en los componentes de alto peso molecular del LPS (es decir, el típico patrón en escalera que representa las cadenas laterales del AgO) mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. En trabajos previos de otros autores, se ha observado que mínimas cantidades del LPS de *E. coli* (del orden de nanogramos) parecen formar multímeros, no asociados covalentemente, en los geles que contengan un 0,1% de SDS o menos. Estos multímeros son responsables de bandas anómalas y del oscurecimiento que aparece o se solapa con las bandas del antígeno O del LPS [379]. En este contexto, el uso del 0,5% SDS en la electroforesis en geles de poliacrilamida ayuda a dispersar los agregados del LPS y resulta una mejor y más clara resolución del antígeno-O en bandas de alto peso molecular que cuando se usa el 0,1% de SDS o menos [379]. En este trabajo de tesis se corroboraron los resultados de Peterson & McGroarty [379] ya que los resultados del estudio realizado del LPS de *E. coli* en geles de poliacrilamida con diferentes concentraciones de SDS demostraron que el uso del 0,5% de SDS permitió una mejor separación de los componentes de alto peso molecular en las muestras del LPS de cepas de *E. coli*, permitiéndonos una mejor caracterización de los cambios del LPS que se asociaron al desarrollo de resistencia a quinolonas. Ello, probablemente, fue debido a las propiedades del detergente iónico usado, el dodecil-sulfato sódico (SDS), que es un buen agente disociante del LPS bacteriano, como se ha descrito previamente [225]. Por otro lado, el EDTA también se ha descrito como un agente que puede disminuir la agregación del LPS [251]. En este estudio el uso de EDTA no resultó en un claro patrón de bandas escalonado del AgO, aunque sí hubo una menor agregación de los componentes de bajo peso molecular del LPS (core y moléculas del lípido A) que usando el 0,5% de SDS.

Sección 5
Conclusiones



12 CONCLUSIONES

1 La quinolona más efectiva frente a los 112 aislados clínicos de *E. coli* fue la ciprofloxacina, seguida de la ofloxacina, temafloxacina, norfloxacina y lomefloxacina. Sólo cuatro de las 112 cepas fueron resistentes al ácido nalidíxico.

2 Por su parte, el antibiótico β-lactámico más efectivo fue el meropenem, aunque todos los aislamientos clínicos de *E. coli* fueron también sensibles a imipenem, cefoxitina, cefazolina, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona y cefpiroma.

3 En la selección de mutantes resistentes a quinolonas en *E. coli*, las mayores frecuencias de selección se obtuvieron con lomefloxacina. Sin embargo, en las otras especies de enterobacterias las menores frecuencias de selección se apreciaron cuando el agente selectivo fue la norfloxacina.

4 Se apreció una alta correlación entre el desarrollo de resistencia a norfloxacina o lomefloxacina y otras fluoroquinolonas.

5 Asimismo, se demostró correlación estadísticamante significativa entre las CMIs de norfloxacina y lomefloxacina y las de cefotixina, cefotaxima, ceftazidima, ceftizoxima y meropenem en los dieciocho mutantes de *E. coli* seleccionados con quinolonas.

6 Los 18 mutantes seleccionados con fluoroquinolonas desarrollaron un fenotipo de resistencia a múltiples antimicrobianos incluyendo quinolonas, cefalosporinas, tetraciclina y cloranfenicol. Los defectos en la acumulación estuvieron también presentes en las cepas origen de *E. coli* y en siete de ellas se constató además la presencia de un transporte activo protón-dependiente para la norfloxacina, cuya inhibición elevó el nivel de la fluoroquinolona acumulada en la célula bacteriana. En las restantes tres cepas origen (2P, 3P y 4P) no se descarta la participación de sistemas de expulsión activa no protón-dependientes para las fluoroquinolonas ensayadas.

7 Entre los mecanismos responsables del desarrollo de resistencia a quinolonas en los dieciocho mutantes de *E. coli* y sus diez cepas origen, las mutaciones en la ADN girasa y topoisomerasa IV jugaron un papel principal. Los defectos en la permeabilidad de la pared bacteriana y la presencia de sistemas de expulsión activa fueron factores que sumados a la presencia de mutaciones en las topoisomerasas bacterianas, determinaron el alto nivel de resistencia a quinolonas encontrado en los mutantes.

8 La sustitución Ser83 por Leu en la subunidad A de la ADN girasa fue la mutación más frecuente en cepas de *E. coli* resistentes a quinolonas, estando presente en

catorce de los mutantes desarrollados y en tres de las cepas origen.

9 En las cepas origen y mutantes de *E. coli* resistentes a quinolonas, las sustituciones Ser83 por Leu, así como Asp87 por Asn en la subunidad A de la ADN girasa, se asociaron a los mayores niveles de resistencia a fluoroquinolonas, mientras que la sustitución de Ser-83 por Ala se asoció a menores valores de CMIs, tanto del ácido nalidíxico como de las fluoroquinolonas valoradas.

10 La única mutación localizada en ParC (Ser80 por Arg) y detectada en la cepa *E. coli* 5N no introdujo un mayor nivel de resistencia respecto a la cepa 5L.

11 El desarrollo de fenotipos de múltiple resistencia en los dieciocho mutantes de *E. coli* desarrollados no supuso siempre la pérdida de expresión de la porina F, ya que ello sólo ocurrió en once de los dieciocho mutantes.

12 En los mutantes de *E. coli* resistentes a quinolonas, la pérdida de expresión de la porina F fue ligeramente más frecuente en los mutantes seleccionados con norfloxacina que en los seleccionados con lomefloxacina (en una relación de 6:5).

13 La disminución de la acumulación bacteriana de quinolonas fue otro de los mecanismos presentes en las cepas de *E. coli* que desarrollaron resistencia a quinolonas. En este sentido, el defecto en la acumulación no estuvo siempre asociado a la pérdida de la porina F, ya que sólo ocho de los once mutantes de *E. coli*, resistentes a quinolonas y deficientes en dicha porina, mostraron un menor nivel de acumulación que sus cepas origen.

14 Se confirmó la presencia de un transporte transmembrana protón-dependiente para la norfloxacina en quince de los mutantes de *E. coli* estudiados, que contribuyó en ellos como mecanismo complementario al desarrollo de resistencia a quinolonas.

15 La pérdida de expresión de la porina F en los mutantes de *E. coli* se asoció también al incremento de resistencia a antibióticos β-lactámicos en los once mutantes que mostraron tal defecto en sus proteínas de membrana externa. En los dos mutantes de *E. coli* en los que la pérdida de expresión de la porina F coincidió con la pérdida de expresión de la porina C el incremento de resistencia a cefalotina y/o cefoxitina fue mayor que en los restantes nueve mutantes de *E. coli*.

16 El incremento de resistencia a cefalosporinas se apreció también en los seis mutantes de *E. coli* no deficientes en porinas F y/o C, involucrando la posible participación de sistemas de transporte transmembrana para estos antibióticos.

17 Sólo dos de los dieciocho mutantes de *E. coli* resistentes a quinolonas mostraron cambios en la expresión del lipopolisacárido asociados al desarrollo de resistencia a quinolonas (las cepas 5N y 10N) cuyo fenotipo fue similar al de los mutantes NorC descritos en trabajos previos.

18 Asimismo, todos los mutantes de las especies *Citrobacter diversus, Citrobacter freundii, Enterobacter cloacae, Klebsiella pneumoniae, Proteus vulgaris* y *Salmonella enteritidis*, es decir, los mutantes originados a partir de las cepas 12P, 13P, 14P, 15P, 16P, 17P y 18P, desarrollaron un fenotipo de resistencia a mútiples antimicrobianos, incluyendo quinolonas, cefalospori-

nas y tetraciclina entre otros.

19 En el estudio comparativo sobre cambios en la permeabilidad y acumulación de fluoroquinolonas realizados con enterobacterias de otras especies los resultados fueron paralelos a los obtenidos en los mutantes de *E. coli*. En este contexto, los mutantes seleccionados con norfloxacina en las cepas de *Citrobacter diversus, Citrobacter freundii, Enterobacter cloacae, Klebsiella pneumoniae y Salmonella enteritidis* mostraron la pérdida de expresión de proteínas mayores de la membrana externa asociados al fenotipo de múltiple resistencia, así como defectos en el nivel de acumulación de norfloxacina. Esta menor acumulación fue debida tanto al defecto de permeabilidad como al mecanismo de transporte transmembrana protón-dependiente. Sin embargo, en los mutantes seleccionados con lomefloxacina de las especies de *Citrobacter freundii, Enterobacter cloacae, Klebsiella pneumoniae* y de *Salmonella enteritidis* no se apreciaron diferencias en el perfil electroforético de sus proteínas de membrana externa con los de sus respectivas cepas origen.

20 En todos los mutantes estudiados de las especies *Citrobacter diversus, Citrobacter freundii, Enterobacter cloacae, Klebsiella pneumoniae, Proteus vulgaris y Salmonella enteritidis*, se detectó la presencia de un transporte transmembrana protón dependiente que afectó al nivel de acumulación de norfloxacina en la célula bacteriana y que debió contribuir al desarrollo de resistencia a quinolonas observado en ellos.

21 El desarrollo de mutantes con fenotipo de múltiple resistencia a antimicrobianos, deficientes en proteínas mayores de su membrana externa y con lipopolisacárido rugoso, sólo se detectó en el mutante 15L de la especie *Enterobacter cloacae*.

22 También los tres mutantes seleccionados con ceftazidima desarrollaron fenotipos de resistencia a múltiples antimicrobianos, incluyendo quinolonas, tetraciclina y acriflavina entre otros.
El incremento de resistencia a cefalosporinas observado en las cepas seleccionadas con ceftazidima sólo se asoció a la pérdida de expresión de la porina F y a la presencia de filamentación en la célula bacteriana, pero no a un incremento significativo de la actividad hidrolítica de β-lactamasas, ni se vio influido por un inhibidor del transporte transmembrana protón-dependiente. Sin embargo, el alto nivel de incremento de las CMIs de cefalosporinas como ceftazidima y cefotaxima en estos mutantes no puede ser explicado exclusivamente por la pérdida de la porina F.

23 Por su parte, el incremento de resistencia a cefalosporinas en la cepa mutante *E. coli* 7L no pudo ser explicado por defectos en la permeabilidad, ni siquiera en parte, ya que no fue deficiente en dicha porina, y tampoco se vio influido por la presencia de un inhibidor del transporte transmembrana protón-dependiente. La cepa 7L, así como las cepas 7C y 11C, también presentaron filamentación en su morfología.

24 Los mutantes aislados *in vitro* mediante el efecto selectivo con norfloxacina o lomefloxacina, tanto en las cepas de *E coli* como en las cepas de otras especies de la familia *Enterobacteriaceae*, presentaron cada vez más fenotipos de multirresistencia similares a los descritos en los frecuentes aislamientos clínicos y veterinarios

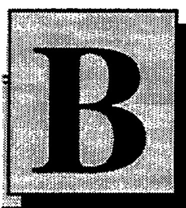
25 Las mutaciones en las topisomerasas bacterianas jugaron el papel principal en el desarrollo de resistencia en los dieciocho mutantes de *E coli,* Nor o Lmf, como también es común en las cepas de *E*

coli descritas más recientemente en aislamientos clínicos y veterinarios. Tanto en los mencionados mutantes como en cepas resistentes desarrolladas *in vivo* la presencia de mecanismos de expulsión activa y defectos en la permeabilidad contribuyen a determinar altos niveles de resistencia a quinolonas.

26 También, de la familia *Enterobacteriaceae* desarrollados en esta tesis, la permeabilidad y el incremento del transporte transmebrana protón-dependiente fueron factores contribuyentes al desarrollo de altos niveles de resistencia a fluoroquinolonas y otros antimicrobianos, como también lo son en aislados clínicos y veterinarios más recientemente descritos.

27 El uso del 0,5% de SDS en geles de poliacrilamida para la separación de extractos del lipopolisacárido de la membrana externa bacteriana permitió una mayor resolución de sus componentes de alto peso molecular.

28 Finalmente, el uso de una concentración de 20 mM de EDTA en los geles de poliacrilamida, al realizar la electroforesis de extractos del lipopolisacárido, mejoró la separación en bandas de los componentes de bajo peso molecular del lipopolisacárido bacteriano.



IBLIOGRAFÍA

1. (1998) Grepafloxacin -- a new fluoroquinolone. *Med. Lett. Drugs Ther.*, 40 (1019) :17-18.

2. (1999) Base de datos del medicamento: Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. - URL: http://www. cof. es

3. (1999) J03B2A: Fluoroquinolonas. *En*: Catálogo de especialidades farmacéuticas. ¤ Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, Madrid. 1151-1162.

4. **Aggeler R., R. L. Then, y R. Ghosh** (1987) Reduced expression of outer membrane proteins in β-lactam-resistant mutants of *Enterobacter cloacae. J. Gen. Microbiol.*, 133:3383-3392.

5. **Akova M., Y. Yang, y D. M. Livermore** (1990) Interactions of tazobactam and clavulanate with inducibly- and constitutively-expressed Class I β-lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2:199-208.

6. **Albertí Sebastián, G. Marqués, Santiago Hernández-Allés** ***et al.*** (1996) Interaction between complement subcomponent C1q and the *Klebsiella pneumoniae* porin OmpK36. *Infect. Immun.*, 64 (11) :4719-4725.

7. **Albertí Sebastián, F. Rodríguez-Quiñones, T. Schirmer** ***et al.*** (1995) A porin from *Klebsiella pneumoniae*: sequence homology, three dimensional model, and complement binding. *Infect. Immun.*, 63 (3) :903-910.

8. **Alekshun Michael N. y Stuart B. Levy** (1997) Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the *mar* regulon. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41 (10) :2067-2075.

9. **Alghasham A. A. y M. C. Nahata** (1999) Trovafloxacin: a new fluoroquinolone. *Ann. Pharmacother.*, 33 (1) :48-60.

10. **Allocco A., F. Giachino, L. Tuninetti** ***et al.*** (1992) [Urinary infection. II. Comparative *in vitro* activities of several antibiotic drugs against Gram-positive bacteria]. *G. Batteriol. Virol. Immunol.*, 85 (1-12) :68-78.

11. **Alonso-Urmeneta B**. (1995) Conservación y mantenimiento de bacterias. *En*: B. Alonso-Urmeneta, V. Aragón, y J. A. Bengoechea, eds. : Manual práctico de Microbiología. ¤ Masson, Barcelona. 11-21.

12. **Alonso R., A. Fernández Aránguiz, K. Colom** ***et al.*** (1993) Estudio multicéntrico de la actividad *in vitro* de ofloxacino. *Rev. Esp. Quimioter.*, 6:160-163.

13. **Amaral L., Y. Lee, U. Schwarz** ***et al.*** (1986) Penicillin-binding site on the *Escherichia coli* cell envelope. *J. Bacteriol.*, 167 (2) :492-495.

14. **Amicosante G., J. M. Frere, N. Franceschini** ***et al.*** (1991) Some molecular properties of *Citrobacter diversus* β-lactamases. *J. Chemother.*, 2:83-85.

15. **Amicosante G., A. Oratore, N. Franceschini** ***et al.*** (1988) *Citrobacter diversus* ULA-27

β-lactamases. Improved purification and general properties. *Biochem. J.*, 254 (3) :885-890.

16. **Amyes S. G.** (1997) Antibiotic resistance. Resistance mediated by inhibitor-resistant and extended-spectrum TEM and SHV β-lactamases. *J. Med. Microbiol.*, 46 (6) :454-457.

17. **Andersen J. y N. Delihas** (1990) *micF* RNA binds to the 5' end of *ompF* mRNA and to a protein from *Escherichia coli. Biochemistry,* 29 (39) :9249-9256.

18. **Aoyama Hiroshi, Kazuo Fujimaki, Kenichi Sato *et al.*** (1988) Clinical isolate of *Citrobacter freundii* highly resistant to new quinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 32 (6) :922-924.

19. **Appelbaum P. C.** (1995) Quinolone activity against anaerobes: microbiological aspects. *Drugs,* 49 (Supl 2) :76-80.

20. **Appelbaum Peter C.** (1991) Mechanisms and frequency of resistance to temafloxacin. *Am. J. Med.*, 91 (suppl 6A) :27S-30S.

21. **Ardanuy C., J. Linares, M. A. Domínguez *et al.*** (1998) Outer membrane profiles of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates from clinical samples and activities of cephalosporins and carbapenems. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42 (7) :1636-1640.

22. **Azanza Perea J. R., E. García Quetglas, B. Sádaba Díaz de Rada *et al.*** (1997) Farmacocinética de trovafloxacino. Significación clínica. *Drugs of Today,* 33:33-42.

23. **Álvarez-Bravo J., M. J. de Oro-Pulido, y el Grupo Español de Estudio de Piperacilina-Tazobactam** (1998) Estudio multicéntrico nacional de la sensibilidad a piperacilina-tazobactam de patógenos hospitalarios. *Rev. Esp. Quimioter.*, 11 (Supl 3) :91-97.

24. **Álvarez Benito M. Victoria, Ernesto Boquet Jiménez, y M. Isabel de Fez y Camino** (1990) Manual de técnicas en microbiología clínica. 2ª ed. ¤ Asociación Española de Farmacéuticos Analistas / Editorial Garsi, S. A., Madrid.

25. **Babini G. S., M. Yuan, y D. M. Livermore** (1998) Interactions of β-lactamases with sanfetrinem (GV 104326) compared to those with imipenem and with oral β-lactams. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42 (5) :1168-1175.

26. **Bachoual R., J. Tankovic, y C. J. Soussy** (1998) Analysis of the mutations involved in fluoroquinolone resistance of *in vivo* and *in vitro* mutants of *Escherichia coli. Microb. Drug Resist.*, 4 (4) :271-276.

27. **Bagel S., V. Hullen, B. Wiedemann *et al.*** (1999) Impact of *gyrA* and *parC* mutations on quinolone resistance, doubling time, and supercoiling degree of *Escherichia coli. Antimicrob. Agents Chemother.*, 43 (4) :868-875.

28. **Ball P.** (1994) Bacterial resistance to fluoroquinolones: lessons to be learned. *Infection,* 22 (Supl 2) :S140-S147.

29. **Baquero F.** (1993) Actividad antimicrobiana de pefloxacino. *Rev. Esp. Quimioter.*, 6:17-23.

30. **Baquero F. y R. Cantón** (1996) *In-vitro* activity of sparfloxacin in comparison with currently available antimicrobials against respiratory tract pathogens. *J. Antimicrob. Chemother.*, 37 (Supl A) :1-18.

31. **Barr W. H., C. C. Lin, E. Radwanski *et al.*** (1991) The pharmacokinetics of ceftibuten in humans. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 14 (1) :93-100.

32. **Barriere S. L.** (1992) Pharmacology and pharmacokinetics of cefprozil. *Clin. Infect. Dis.*, 14 (Supl 2) :S184-S188.

33. **Barriere S. L.** (1993) Review of *in vitro* activity, pharmacokinetic characteristics, safety, and clinical efficacy of cefprozil, a new oral cephalosporin. *Ann. Pharmacother.*, 27 (9) :1082-1089.

34. **Barry A. L., S. D. Brown, y P. C. Fuchs** (1996) *in vitro* activity of ceftizoxime, ceftazidime, cefuroxime, ceftriaxone, cefotaxime, and penicillin against Streptococcus pneumoniae as determined by three quantitative

methods. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 15 (4) :344-346.

35. **Barry A. L. y P. C. Fuchs** (1997) Antibacterial activities of grepafloxacin, ciprofloxacin, ofloxacin and fleroxacin. *J. Chemother.*, 9 (1) :9-16.

36. **Barry A. L., P. C. Fuchs, y S. D. Brown** (1996) *In vitro* activities of five fluoroquinolone compounds against strains of *Streptococcus pneumoniae* with resistance to other antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40 (10) :2431-2433.

37. **Barry Arthur L. y Peter C. Fuchs** (1991) *In vitro* activities of sparfloxacin, tosufloxacin, ciprofloxacin, and fleroxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 35 (5) :955-960.

38. **Bascomb S., S. P. Lapage, W. R. Willcox** *et al.* (1971) Numerical classification of the tribe *Klebsielleae*. *J. Gen. Microbiol.*, 66 (3) :279-295.

39. **Bauer K., A. Schmid, W. Boos** *et al.* (1988) Pore formation by *pho*-controlled outer-membrane proteins of various *Enterobacteriaceae* in lipid bilayers. *Eur. J. Biochem.*, 174 (1) :199-205.

40. **Bauernfeind A.** (1991) Comparative antimicrobial spectrum and activity of ceftibuten against clinical isolates from West Germany. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 14 (1) :63-74.

41. **Bauernfeind A. y R. Jungwirth** (1991) Antibacterial activity of cefpodoxime in comparison with cefixime, cefdinir, cefetamet, ceftibuten, loracarbef, cefprozil, BAY 3522, cefuroxime, cefaclor and cefadroxil. *Infection*, 19 (5) :353-362.

42. **Bauernfeind A., R. Jungwirth, S. Schweighart** *et al.* (1990) [Antibacterial activity and β-lactamase stability of eleven oral cephalosporins]. *Infection*, 18 (Supl 3) :S155-S167.

43. **Bazile-Pham-Khac Sandrine, Que Chi Truong, Jean-Pierre Lafont** *et al.* (1996) Resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* isolated from poultry. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40 (6) :1504-1507.

44. **Bennett Peter M. y Ian Chopra** (1993) Molecular basis of β-lactamase induction in bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 37 (2) :153-158.

45. **Benz Roland, Angela Schmid, y Robert E. W. Hancock** (1985) Ion selectivity of gram-negative bacterial porins. *J. Bacteriol.*, 162 (2) :722-727.

46. **Bergstrom L. C., L. Qin, S. L. Harlocker** *et al.* (1998) Hierarchical and co-operative binding of OmpR to a fusion construct containing the *ompC* and *ompF* upstream regulatory sequences of *Escherichia coli*. *Genes Cells*, 3 (12) :777-788.

47. **Bhat K. G., A. T. Andrade, S. G. Karadesai** *et al.* (1998) Antimicrobial susceptibility of *Salmonella typhi* to quinolones & cephalosporins. *Indian J. Med. Res.*, 107:247-251.

48. **Bingen E.** (1987) Mecanismo de acción de los betalactámicos. ¤ Roussel Ibérica, S. A., Madrid.

49. **Blondeau J. M.** (1999) A review of the comparative in-vitro activities of 12 antimicrobial agents, with a focus on five new respiratory quinolones. *J. Antimicrob. Chemother.*, 43 (Supl B) :1-11.

50. **Blondeau J. M.** (1999) Expanded activity and utility of the new fluoroquinolones: a review. *Clin. Ther.*, 21 (1) :3-40.

51. **Borin M. T.** (1991) A review of the pharmacokinetics of cefpodoxime proxetil. *Drugs*, 42 (Supl 3) :13-21.

52. **Boyce J. M., A. A. Medeiros, E. F. Papa** *et al.* (1990) Induction of β-lactamase and methicillin resistance in unusual strains of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *J. Antimicrob. Chemother.*, 25 (1) :73-81.

53. **Bradford P. A., N. V. Jacobus, N. Bhachech** *et al.* (1996) TEM-28 from an *Escherichia coli* clinical isolate is a member of the His-164 family of TEM-1 extended-spectrum β-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40 (1) :260-262.

54. **Bradford P. A., C. Urban, A. Jaiswal** *et al.*

(1995) SHV-7, a novel cefotaxime-hydrolyzing β-lactamase, identified in *Escherichia coli* isolates from hospitalized nursing home patients [erratas publicadas en *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995, 39 (7) :1646]. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39 (4) :899-905.

55. **Bradford P. A., C. Urban, N. Mariano *et al.*** (1997) Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC β-lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41 (3) :563-569.

56. **Brakstad O. G. y J. A. Maeland** (1997) Mechanisms of methicillin resistance in staphylococci. *APMIS*, 105 (4) :264-276.

57. **Breines David M., Saliha Ouabdesselam, Eva Y. Ng *et al.*** (1997) Quinolone resistance locus *nfxD* of *Escherichia coli* is a mutant allele of the *parE* gene encoding a subunit of topoisomerase IV. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41 (1) :175-179.

58. **Brenner D. J.** (1978) Characterization and clinical identification of Enterobacteriaceae by DNA hybridization. *Prog. Clin. Pathol.*, 7:71-117.

59. **Brenner D. J., G. R. Fanning, F. J. Skerman *et al.*** (1972) Polynucleotide sequence divergence among strains of *Escherichia coli* and closely related organisms. *J. Bacteriol.*, 109 (3) :933-965.

60. **Brenner D. J., G. R. Fanning, y A. G. Steigerwalt** (1972) Deoxyribonucleic acid relatedness among species of *Erwinia* and between *Erwinia* species and other enterobacteria. *J. Bacteriol.*, 110 (1) :12-17.

61. **Brenner Don J.** (1984) Facultatively Anaerobic Gram-Negative Rods: Family I. *Enterobacteriaceae*. *En*: Noel R. Krieg y John G. Holt, eds. : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Vol 1) . 1ª ed. ¤ Williams & Wilkins, Baltimore. 6 Vols, Vol 1°, (Cap5) :408-503.

62. **Brodsky A. L., C. J. Minissale, M. J. Melero *et al.*** (1993) Profilaxis con fluoroquinolonas en pacientes neutropénicos. *Medicina. (B. Aires)*, 53 (5) :401-407.

63. **Brown J. C., P. M. Shanahan, M. V. Jesudason *et al.*** (1996) Mutations responsible for reduced susceptibility to 4–quinolones in clinical isolates of multi-resistant *Salmonella typhi* in India. *J. Antimicrob. Chemother.*, 37 (5) :891-900.

64. **Bryan L. E. y J. Bedard** (1991) Impermeability to quinolones in gram-positive and gram-negative bacteria. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 10 (4) :232-239.

65. **Bryan L. E., K. O'Hara, y S. Wong** (1984) Lipopolysaccharide changes in impermeability-type aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 26 (2) :250-255.

66. **Buchanan R. E. y N. E. Gibbons** (1974) *En*: R. E. Buchanan y N. E. Gibbons, eds.: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8ª ed. ¤ Williams & Wilkins, Baltimore.

67. **Bush K.** (1986) Evaluation of enzyme inhibition data in screening for new drugs. *Drugs Exp. Clin. Res.*, 12 (6-7) :565-576.

68. **Bush K.** (1989) Characterization of β-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 33:259-263.

69. **Bush K.** (1997) Antimicrobial agents. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1 (2) :169-175.

70. **Bush K.** (1997) The evolution of β-lactamases. *Ciba Found. Symp.*, 207:152-163.

71. **Bush K., G. A. Jacoby, y A. A. Medeiros** (1995) A functional classification scheme for β-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39 (6) :1211-1233.

72. **Bush K. y R. Sikes** (1984) Interaction of β-lactam antibiotics with β-lactamases as cause for resistance. *En*: L. E. Bryan, ed. : Antimicrobial Drugs Resistance. ¤ Academic Press, London. 1-31.

73. **Bush K. y R. B. Sykes** (1986) Methodology

for the study of β-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 30 (1) :6-10.

74. **Bush L. M., J. Calmon, y C. C. Johnson** (1995) Newer penicillins and β-lactamase inhibitors. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, 9 (3) :653-686.

75. **Cambau E. y L. Gutmann** (1993) Mechanisms of resistance to quinolones. *Drugs*, 45 (Supl 3) :15-23.

76. **Cantón E., M. Gobernado, T. Jiménez *et al.*** (1989) Lomefloxacin: Laboratory study of antibacterial activity. *Rev. Esp. Quimioter.*, 2 (3) :237-244.

77. **Cantón E., J. Pemán, M. T. Jiménez *et al.*** (1992) *In vitro* activity of sparfloxacin compared with those of five other quinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 36 (3) :558-565.

78. **Cardenal J. I., E. García-Onieva, M. Macías *et al.*** (1996) Resistencias de *Escherichia coli* a las quinolonas en un área de Cáceres (Extremadura) . *Rev. Esp. Quimioter.*, 9 (4) :266-269.

79. **Casellas J. M., M. Goldberg, N. Orellana *et al.*** (1990) *In vitro* activity of cefpirome compared with other third generation cephalosporins against nosocomial isolates in Argentina. *Infection*, 18 (3) :193-195.

80. **Cazzola M., C. Franco, V. Gioia *et al.*** (1991) Cefaclor in the treatment of infective exacerbations of chronic bronchitis in cigarette smokers. *J. Chemother.*, 3 (4) :245-249.

81. **Celesk Roger A. y Norman J. Robillard** (1989) Factors influencing the accumulation of ciprofloxacin in *Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob. Agents Chemother.*, 33 (11) :1921-1926.

82. **Chang H. R., L. H. Loo, K. Jeyaseelan *et al.*** (1997) Phylogenetic relationships of *Salmonella typhi* and *Salmonella typhimurium* based on 16S rRNA sequence analysis. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47:153-1254.

83. **Chapman John S. y Nafsika H. Georgopapadakou** (1988) Routes of quinolone permeation in *Escherichia coli. Antimicrob. Agents Chemother.*, 32 (4) :438-442.

84. **Charrel R. N., J. M. Pages, P. De Micco *et al.*** (1996) Prevalence of outer membrane porin alteration in β-lactam-antibiotic-resistant *Enterobacter aerogenes. Antimicrob. Agents Chemother.*, 40:2854-2858.

85. **Chen H. Y. y D. M. Livermore** (1994) Comparative in-vitro activity of biapenem against enterobacteria with β-lactamase-mediated antibiotic resistance. *J. Antimicrob. Chemother.*, 33 (3) :453-464.

86. **Chen H. Y. y D. M. Livermore** (1994) In-vitro activity of biapenem, compared with imipenem and meropenem, against *Pseudomonas aeruginosa* strains and mutants with known resistance mechanisms. *J. Antimicrob. Chemother.*, 33 (5) :949-958.

87. **Chen H. Y., M. Yuan, y D. M. Livermore** (1995) Mechanisms of resistance to β-lactam antibiotics amongst *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected in the UK in 1993. *J. Med. Microbiol.*, 43 (4) :300-309.

88. **Chocas E. C., C. M. Paap, y P. J. Godley** (1993) Cefpodoxime proxetil: a new, broad-spectrum, oral cephalosporin. *Ann. Pharmacother.*, 27 (11) :1369-1377.

89. **Chou Joseph H., Jean T. Greenberg, y Bruce Demple** (1998) Posttranscriptional repression of *Escherichia coli* OmpF protein in response to redox stress: Positive control of the *micF* antisense RNA by the *soxRS* locus. *J. Bacteriol.*, 175 (4) :1026-1031.

90. **Chow Joseph W. y David M. Shlaes** (1991) Imipenem resistance associated with the loss of a 40 kDa outer membrane protein in *Enterobacter aerogenes. J. Antimicrob. Chemother.*, 28:499-504.

91. **Christ W.** (1991) Pharmacological properties of cephalosporins. *Infection*, 19 (Supl 5) :S244-S252.

92. **Christenson J. C., E. Swenson, W. M. Gooch (III) *et al.*** (1991) Comparative efficacy and safety of cefprozil (BMY-28100) and cefaclor in the treatment of acute group A β-hemolytic

streptococcal pharyngitis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 35 (6) :1127-1130.

93. **Chu Daniel T. W. y Prabhavathi B. Fernandes** (1989) Structure-activity relationships of the fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 33 (2) :131-135.

94. **Cisterna R., K. Colom, y R. Alonso** (1990) Estudio multicéntrico de la resistencia a cefotaxima mediante un estudio de prevalencia. *Rev. Esp. Quimioter.*, 3 (2) :181-186.

95. **Cohen Seth P., David C. Hooper, John S. Wolfson** ***et al.*** (1988) Endogenous active efflux of norfloxacin in susceptible *Escherichia coli. Antimicrob. Agents Chemother.*, 32 (8) :1187-1191.

96. **Cohen Seth P., Laura M. McMurry, David C. Hooper** ***et al.*** (1989) Cross-resistance to fluoroquinolones in multiple-antibiotic-resistance (Mar) *Escherichia coli* selected by tetracycline or chloramphenicol: Decreased drug accumulation associated with membrane changes in addition to OmpF reduction. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 33 (8) :1318-1325.

97. **Cohen Seth P., Laura M. McMurry, y Stuart B. Levy** (1988) *marA* locus causes decreased expression of OmpF porin in multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants of *Escherichia coli. J. Bacteriol.*, 170 (12) :5416-5422.

98. **Colom K., A. Fernández Aránguiz, E. Suinaga** ***et al.*** (1995) Tercer estudio multicéntrico de la actividad *in vitro* de ofloxacino *vs.* ciprofloxacino durante 1994. *Rev. Esp. Quimioter.*, 8 (3) :236-240.

99. **Cornaglia Giuseppe, K. Rusell, Giuseppe Satta** ***et al.*** (1995) Relative importances of outer membrane permeability and group 1 β-lactamase as determinants of meropenem and imipenem activities against *Enterobacter cloacae. Antimicrob. Agents Chemother.*, 39:350-355.

100. **Costa F. J.** (1994) Lomefloxacin prophylaxis in visual laser ablation of the prostate. *Urology*, 44 (6) :933-936.

101. **Cozzarelli Nicholas R.** (1980) DNA Gyrase and the supercoiling of DNA. *Science*, 207:953-960.

102. **Cullen M. E., A. W. Wyke, R. Kuroda** ***et al.*** (1989) Cloning and characterization of a DNA gyrase A gene from *Escherichia coli* that confers clinical resistance to 4-quinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 33 (6) :886-894.

103. **Cullmann W. y W. Dick** (1990) Cefpodoxime: comparable evaluation with other orally available cephalosporins. With a note on the role of β-lactamases. *Zentralbl. Bakteriol.*, 273 (4) :501-517.

104. **Cullmann W., R. Frei, y T. Krech** (1993) Antibacterial activity of oral antibiotics against anaerobic bacteria. *Chemotherapy*, 39 (3) :169-174.

105. **Cunha Burke A. y Mary Vanessa Gill** (1995) Cefepime. *Med. Clin. North Am.*, 79 (4) :721-732.

106. **Curtis N. A., L. Eisenstadt, C. Rudd** ***et al.*** (1986) Inducible type I β-lactamases of gram-negative bacteria and resistance to β-lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.*, 17:51-61.

107. **D'Antonio D., R. Piccolomini, A. Iacone** ***et al.*** (1994) Comparison of ciprofloxacin, ofloxacin and pefloxacin for the prevention of the bacterial infection in neutropenic patients with haematological malignancies. *J. Antimicrob. Chemother.*, 33 (4) :837-844.

108. **Danelon G., O. Mascaretti, M. Radice** ***et al.*** (1998) Comparative *in-vitro* activities of GD-40 and other β-lactamase inhibitors against TEM-1 and SHV-2 β-lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.*, 41 (2) :313-315.

109. **Dang P., L. Gutmann, C. Quentin** ***et al.*** (1988) Some porperties of *Serratia marcescens*, *Salmonella paratyphi*, and *Enterobacter cloacae* with non-enzyme-dependent multiple resistance to β-lactam antibiotics, aminoglycosides, and quinolones. *Rev. Infect. Dis.*, 10:899-904.

110. **Dámaso Diego** (1990) Antibacterianos. ¤ Marketing Pharm, S. A. & Roussel, Madrid.

111. **Dámaso Diego** (1990) Mecanismos de resistencia a los antibióticos. *En*: Antibacterianos. ¤ Marketing Pharm, S. A. & Roussel, Madrid. (Cap5) :47-72.

112. **Dámaso Diego** (1990) Quimioterápicos II. Ácido nalidíxico y análogos. Quinolonas. Fluorquinolonas. *En*: Antibacterianos. ¤ Marketing Pharm, S. A. & Roussel, Madrid. (Cap24) :533-584.

113. **de Cock H. y J. Tommassen** (1996) Lipopolysaccharides and divalent cations are involved in the formation of an assembly-competent intermediate of outer-membrane protein PhoE of *E. coli. EMBO J.*, 15 (20) :5567-5573.

114. **Decre D., B. Gachot, J. C. Lucet *et al.*** (1998) Clinical and bacteriologic epidemiology of extended-spectrum β-lactamase-producing strains of *Klebsiella pneumoniae* in a medical intensive care unit. *Clin. Infect. Dis.*, 27 (4) :834-844.

115. **Deguchi T., A. Fukuoka, M. Yasuda *et al.*** (1997) Alterations in the GyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of topoisomerase IV in quinolone-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae. Antimicrob. Agents Chemother.*, 41 (3) :699-701.

116. **Deguchi T., T. Kawamura, M. Yasuda *et al.*** (1997) *In vivo* selection of *Klebsiella pneumoniae* strains with enhanced quinolone resistance during fluoroquinolone treatment of urinary tract infections. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41 (7) :1609-1611.

117. **Deguchi T., M. Yasuda, T. Kawamura *et al.*** (1997) In-vitro antimicrobial activity of HSR-903, a new fluoroquinolone, against clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* with fluoroquinolone resistance-associated amino acid alterations in GyrA and ParC [erratas publicadas en *J. Antimicrob. Chemother.* 1998, 41 (6) :672]. *J. Antimicrob. Chemother.*, 40 (6) :907-909.

118. **Deguchi T., M. Yasuda, KawamuraT *et al.*** (1997) Improved antimicrobial activity of DU-6859a, a new fluoroquinolone, against quinolone-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* isolates with alterations in GyrA and ParC proteins. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41 (11) :2544-2546.

119. **Deguchi T., M. Yasuda, M. Nakano *et al.*** (1996) Uncommon occurrence of mutations in the *gyrB* gene associated with quinolone resistance in clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae. Antimicrob. Agents Chemother.*, 40 (10) :2437-2438.

120. **Deguchi T., M. Yasuda, M. Nakano *et al.*** (1997) Detection of mutations in the *gyrA* and *parC* genes in quinolone-resistant clinical isolates of *Enterobacter cloacae. J. Antimicrob. Chemother.*, 40 (4) :543-549.

121. **Dekitsch C., R. Schein, E. Markopulos *et al.*** (1999) Analysis of mutations to *gyrA* in quinolone-resistant clinical isolates of *Enterobacter cloacae. J. Med. Microbiol.*, 48 (1) :73-77.

122. **Delihas N.** (1997) Antisense *micF* RNA and 5'-UTR of the target *ompF* RNA: phylogenetic conservation of primary and secondary structures. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, (36) :33-35.

123. **Di Giulio A., G. Maurizi, M. A. Saletti *et al.*** (1989) The ultraviolet derivative spectrophotometric determination of neutral liposome-entrapped β-lactam antibiotics. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 10:1159-1164.

124. **Diedrich D. L., M. A. Stein, y C. A. Schnaitman** (1990) Associations of *Escherichia coli* K-12 OmpF trimers with rough and smooth lipopolysaccharides. *J. Bacteriol.*, 172 (9) :5307-5311.

125. **Dirección General de Farmacia y Productos Sanitarios** (1999) Suspensión de comercializacion de Trován® y Turvel®. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*, 23 (3) :95 ¤ http://www. msc.es/farmacia /infmedic/documentos /interes993. pdf.

126. **Díez P. y V. Calderón** (1997) Empleo de antibióticos en veterinaria. *Rev. Esp. Quimioter.*, 10 (4) :275-280.

127. **Doménech-Sánchez A., Santiago Hernández-Allés, Luis Martínez-Martínez *et al.*** (1999) Identification and characterization of a new

porin gene of *Klebsiella pneumoniae*: its role in β-lactam antibiotic resistance. *J. Bacteriol.*, 181 (9) :2726-2732.

128. **Du Bois S. K., M. S. Marriott, y S. G. Amyes** (1995) TEM- and SHV-derived extended-spectrum β-lactamases: relationship between selection, structure and function. *J. Antimicrob. Chemother.*, 35 (1) :7-22.

129. **Dutzler R., G. Rummel, Sebastián Albertí *et al.*** (1999) Crystal structure and functional characterization of OmpK36, the osmoporin of *Klebsiella pneumoniae*. *Structure*, 7 (4) :425-434.

130. **Egger L. A. y M. Inouye** (1997) Purification and characterization of the periplasmic domain of EnvZ osmosensor in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 231 (1) :68-72.

131. **Ehrhardt A. F., C. C. Sanders, Kenneth S. Thomson *et al.*** (1993) Emergence of resistance to imipenem in *Enterobacter* isolates masquerading as *Klebsiella pneumoniae* during therapy with imipenem/cilastatin. *Clin. Infect. Dis.*, 17:120-122.

132. **Endtz H. P., J. W. Mouton, J. G. den Hollander *et al.*** (1997) Comparative *in vitro* activities of trovafloxacin (CP-99,219) against 445 gram-positive isolates from patients with endocarditis and those with other bloodstream infections. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41 (5) :1146-1149.

133. **Engel Andreas, Cora-Ann Schoenenberger, y Daniel J. Müller** (1998) High-Resolution Imaging of Native Biological Sample Surfaces with Scanning Probe Microscope. *Abstracts AFM EMBO Course, July 26-30 1998*, Internet (http://www. mih. unibas. ch/EMBO/Abstracts/Mueller_II/index. html)

134. **Entenza J. M., J. Vouillamoz, M. P. Glauser *et al.*** (1999) Efficacy of trovafloxacin in treatment of experimental staphylococcal or streptococcal endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43 (1) :77-84.

135. **Everett Martin J., Yu Fang Jin, Vito Ricci *et al.*** (1996) Contributions of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40 (10) :2380-2386.

136. **Fajardo D. A., J. Cheung, C. Ito *et al.*** (1998) Biochemistry and regulation of a novel *Escherichia coli* K-12 porin protein, OmpG, which produces unusually large channels. *J. Bacteriol.*, 180 (17) :4452-4459.

137. **Fernández-Mora M., R. Oropeza, J. L. Puente *et al.*** (1995) Isolation and characterization of *ompS1*, a novel *Salmonella typhi* outer membrane protein-encoding gene. *Gene*, 158 (1) :67-72.

138. **Ferrero L., B. Cameron, B. Manse *et al.*** (1994) Cloning and primary structure of *Staphylococcus aureus* DNA topoisomerase IV: a primary target of fluoroquinolones. *Mol. Microbiol.*, 13 (4) :641-653.

139. **Filip Camille, Gail Fletcher, Judith L. Wulff *et al.*** (1973) Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by the ionic detergent sodium-lauryl sarcosinate. *J. Bacteriol.*, 115:717-722.

140. **Fisher L. M., R. Hopewell, M. Oram *et al.*** (1990) *En*: H. C. Neu, ed.: The molecular basis of quinolone action and resistance. ¤ Churchill Livingstone, Edinburgh. pp. 177-190.

141. **Foltzer Michael A. y Richard E. Reese** (1991) Bacteriemia y sepsis. *En*: Richard E. Reese y Robert F. Betts, eds. : Un planteamiento práctico de las enfermedades infecciosas. ¤ Jarpyo Editores, Madrid. Vol 3°, (Cap2) :21-59.

142. **Freixas Bazaco J., C. Martorell Coca, y J. M. Poblet Ruis** (1989) Influencia de las propiedades fisicoquímicas de las 6-fluoroquinolonas en la elucidación de su actividad antimicrobiana. *Rev. Esp. Quimioter.*, 2 (3) :232-236.

143. **Freudl Roland, Michael Klose, y Ulf Henning** (1990) Export and sorting of the *Escherichia coli* outer membrane protein OmpA. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 22 (3) :441-449.

144. **Friedberg Errol C., Graham C. Walker, y Wolfram Siede** (1995) SOS responses and DNA damage tolerance in prokaryotes. *En*: DNA repair and mutagenesis. ¤ ASM Press, Washington, D. C. (Cap10) :407-464.

145. **Frías Iniesta J., C. Ibáñez Ruiz, y C. Esteban Calvo** (1999) Seguridad de las fluoroquinolonas diez años después. *Rev. Esp. Quimioter.*, 12 (1) :34-40.

146. **Fung-Tomc J., K. Bush, B. Minassian *et al.*** (1997) Antibacterial activity of BMS-180680, a new catechol-containing monobactam. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41 (5) :1010-1016.

147. **Furet Y. X. y J. C. Pechère** (1991) Newly documented antimicrobial activity of quinolones. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 10 (4) :249-254.

148. **Gainer R. B.** (1995) Cefprozil, a new cephalosporin: its use in various clinical trials. *South. Med. J.*, 88 (3) :338-346.

149. **García-Rodríguez J. A. y E. García Sánchez** (1996) Mecanismos de resistencia de las bacterias a los antimicrobianos. Valoración. *En*: José Ángel García-Rodríguez y Juan J. Picazo, eds. : Microbiología Médica: 1. Microbiología Médica General. ¤ Madrid, 2 Vols, Vol 1°, (Cap6) :93-109.

150. **García-Rodríguez J. A. y J. L. Muñoz Bellido** (1996) Estructura Bacteriana. *En*: José Ángel García-Rodríguez y Juan J. Picazo, eds. : Microbiología Médica: 1. Microbiología Médica General. ¤ Madrid, 2 Vols, Vol 1°, (Cap3) :41-52.

151. **García-Rodríguez José Ángel** (1991) Estructura bacteriana (I) . Elementos obligados: pared celular, membrana citoplásmica y citoplasma. *En*: A. Pumarola, A. Rodríguez-Torres, José Ángel García-Rodríguez *et al*, eds. : Microbiología y parasitología médica. 25-34.

152. **García-Rodríguez José Ángel y E. García-Sánchez** (1996) Antimicrobianos, desinfectantes y antibióticos. *En*: José Ángel García-Rodríguez y Juan J. Picazo, eds. : Microbiología Médica: 1. Microbiología Médica General. ¤ Mosby/Doyma Libros, Madrid. (Cap5) :73-91.

153. **García de Lomas J. y C. Gimeno** (1994) Actividad antimicrobiana de ofloxacino. *Rev. Esp. Quimioter.*, 7:1-6.

154. **García Rodríguez J. A.** (1997) Diferencias de trovafloxacino respecto a otras quinolonas. *Drugs of Today*, 33:1-3.

155. **García Rodríguez J. A.** (1997) Quinolonas de tercera generación: una nueva oportunidad terapéutica. *Rev. Esp. Quimioter.*, 10:1-2.

156. **García Rodríguez J. A., M. J. Fresnadillo, M. I. García García *et al.*** (1995) Multicenter spanish study of ciprofloxacin susceptibility in gram-negative bacteria. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 14:456-459.

157. **García Rodríguez J. A., J. E. García Sánchez, J. L. Muñoz Bellido *et al.*** (1990) *In vitro* activities of Irloxacin and E-3846, two new quinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 346 (6) :1262-1267.

158. **Gargalianos P., B. A. Oppenheim, P. Skepastianos *et al.*** (1988) Activity of cefpirome (HR810) against *Pseudomonas aeruginosa* strains with characterized resistance mechanisms to β-lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.*, 6:841-848.

159. **Gavini F., D. Izard, P. A. Trinel *et al.*** (1981) [Taxonomic study of enterobacteria belonging or related to *Escherichia coli* species]. *Can. J. Microbiol.*, 27 (1) :98-106.

160. **Gavini F., H. Leclerc, B. Lefebvre *et al.*** (1977) [Taxonomic study of enterobacteria belonging or related to the genus *Klebsiella*]. *Ann. Microbiol. (Paris)*, 128B (1) :45-59.

161. **Gazouli M., L. S. Tzouvelekis, A. C. Vatopoulos *et al.*** (1998) Transferable class C β-lactamases in *Escherichia coli* strains isolated in Greek hospitals and characterization of two enzyme variants (LAT-3 and LAT-4) closely related to *Citrobacter freundii* AmpC β-lactamase. *J. Antimicrob. Chemother.*, 42 (4) :419-425.

162. **Gellert M., K. Mizuuchi, N. H. O'Dea *et al.*** (1976) DNA gyrase: An enzime that introduces superhelical turns into DNA. *Biochemistry,* 73:3872-3876.

163. **Gensberg K., Y. F. Jin, y L. J. Piddock** (1995) A novel *gyrB* mutation in a fluoroquinolone-resistant clinical isolate of *Salmonella typhimurium.* [erratas publicadas en *FEMS Microbiol. Lett.* 1996, 137 (2-3) :293]. *FEMS Microbiol. Lett.,* 132 (1-2) :57-60.

164. **George A. M., R. M. Hall, y H. W. Stokes** (1995) Multidrug resistance in *Klebsiella pneumoniae*: a novel gene, *ramA*, confers a multidrug resistance phenotype in *Escherichia coli. Microbiology,* 141 ((Pt 8)) :1909-1920.

165. **George Anthony M. y Stuart B. Levy** (1983) Amplifiable resistance to tetracycline, chloramphenicol, and other antibiotics in *Escherichia coli:* Involvement on a non-plasmid-determined efflux of tetracycline. *J. Bacteriol.,* 155 (2) :531-540.

166. **Georgopapadakou N. H.** (1993) Penicillin-binding proteins and bacterial resistance to β-lactams. *Antimicrob. Agents Chemother.,* 37 (10) :2045-2053.

167. **Georgopapadakou N. H. y A. Bertasso** (1991) Effects of quinolones on nucleoid segregation in *Escherichia coli. Antimicrob. Agents Chemother.,* 35 (12) :2645-2648.

168. **Georgopoulos A., R. Schein, A. Buxbaum *et al.*** (1997) Mechanisms of quinolone-resistance in clinical isolates of *Enterobacter cloacae. Clin. Microbiol. Infect. Dis.,* 4:75-81.

169. **Gherna Robert L.** (1981) Preservation. *En*: Philipp Gerhardt, R. G. E. Murray, Ralph N. Costilow *et al*, eds. : Manual of methods for general bacteriology. ¤ American Society for Microbiology, Washington, D. C. (Cap12) :208-217.

170. **Ghosh R., M. Steiert, A. Hardmeyer *et al.*** (1998) Overexpression of outer membrane porins in *E. coli* using pBluescript-derived vectors. *Gene Expr.,* 7 (3) :149-161.

171. **Giachino F., A. Allocco, L. Tuninetti *et al.*** (1992) [Urinary infection. I. Comparative *in vitro* activities of several antibiotic drugs against Gram-negative bacteria]. *G. Batteriol. Virol. Immunol.,* 85 (1-12) :55-67.

172. **Gobernado M., E. Bouza, E. Perea *et al.*** (1998) Estudio multicéntrico nacional de la actividad *in vitro* de piperacilina-tazobactam. *Rev. Esp. Quimioter.,* 11 (2) :139-146.

173. **Goldman J. D., D. G. White, y S. B. Levy** (1996) Multiple antibiotic resistance (*mar*) locus protects *Escherichia coli* from rapid cell killing by fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.,* 40 (5) :1266-1269.

174. **Goldstein F. W. y J. F. Acar** (1995) Epidemiology of quinolone resistance: Europe and North and South America. *Drugs,* 49 (Supl 2) :36-42.

175. **González M. A., A. H. Moranchel, S Duran *et al.*** (1985) Multiple-dose pharmacokinetics of ciprofloxacin administered intravenously to normal volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.,* 28 (2) :235-239.

176. **Gómez-Martínez J., F. Marco, J. Mensa *et al.*** (1999) Actividad *in vitro* de fluoroquinolonas y antibióticos betalactámicos administrados por vía oral frente a aislamientos clínicos de *Escherichia coli. Rev. Esp. Quimioter.,* 12 (1) :54-57.

177. **Gómez J., J. L. Hernández Cardona, T. San Miguel *et al.*** (1996) Evolución de los patrones de resistencia de *Escherichia coli, Proteus mirabilis* y *Klebsiella pneumoniae.* Estudio prospectivo en la región de Murcia (1986-1995) . *Rev. Esp. Quimioter.,* 9 (3) :181-184.

178. **Graham M. N. y T. J. Mantle** (1989) Purification of a class C A-type β-lactamase from a derepressed strain of *Enterobacter cloacae.* Comparison of the wild-type and mutant enzyme with those from strains P99, 208 and GN7471. *Biochem. J.,* 260 (3) :705-710.

179. **Gray Larry D.** (1995) *Escherichia, Salmonella, Shigella,* and *Yersinia. En*: Patrick R.

Murray, Ellen Jo Baron, Michael A. Pfaller *et al*, eds. : Manual of Clinical Microbiology. 6ª ed. ¤ ASM, Press, Washington, DC. (Cap33) :450-456.

180. **Greenberg Jean T., Joseph H. Chou, Paul A. Monach *et al*.** (1991) Activation of oxidative stress genes by mutations at the *soxQ/cfxB/marA* locus of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 173 (14) :4433-4439.

181. **Griggs D. J., K. Gensberg, y L. J. Piddock** (1996) Mutations in *gyrA* gene of quinolone-resistant *Salmonella* serotypes isolated from humans and animals. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40:1009-1013.

182. **Griggs D. J., M. C. Hall, Y. F. Jin *et al*.** (1994) Quinolone resistance in veterinary isolates of *Salmonella*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 33 (6) :1173-1189.

183. **Guay D. R.** (1997) Ceftibuten: a new expanded-spectrum oral cephalosporin. *Ann. Pharmacother.*, 31 (9) :1022-1033.

184. **Gutmann L., D. Billot-Klein, R. Williamson *et al*.** (1988) Mutation of *Salmonella paratyphi* A conferring cross-resistance to several groups of antibiotics by decreased permeability and loss of invasiveness. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 32 (2) :195-201.

185. **Gutmann L., R. Williamson, y N. Moreau** (1985) Cross-resistance to nalidixic acid, trimethoprim and chloramphenicol associated with alterations in outer membrane proteins of *Klebsiella*, *Enterobacter* and *Serratia*. *J. Infect. Dis.*, 151:501-507.

186. **Hakenbeck R. y J. Coyette** (1998) Resistant penicillin-binding proteins. *Cell Mol. Life Sci.*, 54 (4) :332-340.

187. **Hallett Paul y Anthony Maxwell** (1991) Novel quinolone resistance mutations of the *Escherichia coli* DNA gyrase A protein: Enzymatic analysis of the mutant proteins. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 35 (2) :335-340.

188. **Hames B. David** (1990) One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *En*: B. D. Hames y D. Rickwood, eds. : Gel electrophoresis of proteins. A practical approach. 2ª ed. ¤ Oxford University Press, Oxford. (Cap1) :57-59.

189. **Hamilton-Miller J. M. y W. Brumfitt** (1991) Comparative *in vitro* activity of cefixime, cefaclor and loracarbef against urinary pathogens. *Drugs Exp. Clin. Res.*, 17 (10-11) :517-519.

190. **Hancock R. E., S. W. Farmer, Z. S. Li *et al*.** (1991) Interaction of aminoglycosides with the outer membranes and purified lipopolysaccharide and OmpF porin of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 35 (7) :1309-1314.

191. **Hancock Robert E. W.** (1997) The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends Microbiol.*, 5 (1) :37-42.

192. **Hancock Robert E. W. y A. M. Carey** (1979) Outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*: heat-and-2-mercaptoethanol-modifiable proteins. *J. Bacteriol.*, 140:902-910.

193. **Hanson R. S. y J. A. Phillips** (1981) Chemical composition. *En*: Philipp Gerhardt, R. G. E. Murray, Ralph N. Costilow *et al*, eds. : Manual of methods for general bacteriology. ¤ American Society for Microbiology, Washington, D. C. (Cap17) :328-364.

194. **Heisig P.** (1993) High-level fluoroquinolone resistance in a *Salmonella typhimurium* isolate due to alterations in both *gyrA* and *gyrB* genes. *J. Antimicrob. Chemother.*, 32 (3) :367-377.

195. **Heisig Peter** (1996) Genetic evidence for a role of *parC* mutations in development of high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40 (4) :879-885.

196. **Heisig Peter y Regina Tschorny** (1994) Characterization of fluoroquinolone-resistant mutants of *Escherichia coli* selected *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 38 (6) :1284-1291.

197. **Henn Christian, Michael Teschner, Andreas Engel *et al*.** (1996) Real-Time Isocontouring and Texture Mapping Meet New Challenges

in Interactive Molecular Graphics Applications. *J. Struct. Biol.*, 116:86-92.

198. **Herman J. P., E. Jakubczak, D. Izard *et al.*** (1980) [Microcalorimetry in the taxonomy of some groups of Enterobacteriaceae]. *Can. J. Microbiol.*, 26 (4) :413-419.

199. **Hernández-Allés Santiago, Sebastián Albertí, D. Álvarez *et al.*** (1999) Porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae. Microbiology,* 145 ((Pt 3)) :673-679.

200. **Hernández-Allés Santiago, Sebastián Albertí, Xavier Rubires *et al.*** (1995) Isolation of FC3-11, a bacteriophage specific for the *Klebsiella pneumoniae* porin OmpK36, and its use for the isolation of porin-deficient mutants. *Can. J. Microbiol.*, 41:399-406.

201. **Hernández-Allés Santiago, Vicente J. Benedí, L. Martínez-Martínez *et al.*** (1999) Development of resistance during antimicrobial therapy caused by insertion sequence interruption of porin genes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43 (4) :937-939.

202. **Herrera Guadalupe, Vicente Aleixandra, Amparo Urios *et al.*** (1993) Quinolone action in *Escherichia coli* cells carrying *gyrA* and *gyrB* mutations. *FEMS Microbiol. Lett.*, 106 (2) :187-191.

203. **Hirai Keiji, Hiroshi Aoyama, Tsutomu Irikura *et al.*** (1986) Differences in susceptibility to quinolones of outer membrane mutants of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli. Antimicrob. Agents Chemother.*, 29 (3) :535-538.

204. **Hirai Keiji, Hiroshi Aoyama, Seigo Suzue *et al.*** (1986) Isolation and characterization of norfloxacin-resistant mutants of *Escherichia coli* K-12. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 30 (2) :248-253.

205. **Hitchcock Penny J. y Teresa M. Brown** (1983) Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Bacteriol.*, 154 (1) :269-277.

206. **Hoban D. J., R. N. Jones, L. J. Harrell *et al.*** (1993) The North American component (the United States and Canada) of an International Comparative MIC trial monitoring ofloxacin resistance. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 17 (2) :157-161.

207. **Hoellman D. B., S. K. Spangler, M. R. Jacobs *et al.*** (1998) *In vitro* activities of cefminox against anaerobic bacteria compared with those of nine other compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42 (3) :495-501.

208. **Hofbauer H., K. G. Naber, M. Kinzig-Schippers *et al.*** (1997) Urine bactericidal activity of pefloxacin versus norfloxacin in healthy female volunteers after a single 800-mg oral dose. *Infection,* 25 (2) :121-126.

209. **Hoffner S. E., L. Gezelius, y B. Olsson-Liljequist** (1997) *In-vitro* activity of fluorinated quinolones and macrolides against drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis. J. Antimicrob. Chemother.*, 40 (6) :885-888.

210. **Holme David J. y Hazel Peck** (1987) Bioquímica Analítica. ¤ Editorial Acribia, S. A., Zaragoza. pp. 382-401.

211. **Holt C. D. y S. L. Barriere** (1991) Antimicrobial therapy with the new fluoroquinolones. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 4:742-748.

212. **Holt C. D., D. Pharm, y S. L. Barriere** (1992) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antimicrobial agents. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 5:749-754.

213. **Holt John G., Noel R. Krieg, Peter H. A. Sneath *et al.*** (1994) *En*: John G. Holt, Noel R. Krieg, Peter H. A. Sneath *et al*, ed.: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9ª ed. ¤ Williams & Wilkins, Baltimore.

214. **Holt John G., Noel R. Krieg, Peter H. A. Sneath *et al.*** (1994) Group 5: Facultatively Anaerobic Gramnegative Rods. *En*: John G. Holt, Noel R. Krieg, Peter H. A. Sneath *et al*, eds. : Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9ª ed. ¤ Williams & Wilkins, Baltimore. (Cap5) :175-290.

215. **Hoogkamp-Korstanje J. A.** (1997) In-vitro activities of ciprofloxacin, levofloxacin, lomefloxacin, ofloxacin, pefloxacin, sparflo-

xacin and trovafloxacin against gram-positive and gram-negative pathogens from respiratory tract infections. *J. Antimicrob. Chemother.*, 40 (3) :427-431.

216. **Hooper David C.** (1993) Quinolone mode of action-new aspects. *Drugs*, 45:8-14.

217. **Hooper David C.** (1995) Quinolone mode of action. *Drugs*, 49 (Supl 2) :10-15.

218. **Hooper David C. y J. S. Wolfson** (1991) Mode of action of de new quinolones: New data. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 10 (4) :223-231.

219. **Hooper David C., John S. Wolfson, Mary A. Bozza *et al.*** (1992) Genetics and regulation of outer membrane protein expresion by quinolone resistance loci *nfxB*, *nfxC*, and *cfxB*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 36 (5) :1151-1154.

220. **Hooper David C., John S. Wolfson, Eva Y. Ng *et al.*** (1987) Mechanisms of action of and resistance to ciprofloxacin. *Am. J. Med.*, 82 (4A) :12-20.

221. **Hooper David C., John S. Wolfson, Kathleen S. Souza *et al.*** (1986) Genetic and biochemical characterization of norfloxacin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 29 (4) :639-644.

222. **Hori S. y K. Hiramatsu** (1994) [Mechanisms of antimicrobial resistance]. *Nippon. Rinsho.*, 52 (2) :327-331.

223. **Hosaka Masaki, Tokutaro Yasue, Hideyuki Fukuda *et al.*** (1992) *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of AM-1155, a new 6-fluoro-8-methoxy quinolone. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 36 (10) :2108-2117.

224. **Hupkova M., J. Blahova, M. Babalova *et al.*** (1994) [A review of new cephalosporin antibiotics]. *Vnitr. Lek.*, 40 (2) :118-121.

225. **Hurlbert R. E. y I. M. Hurlbert** (1977) Biological and physicochemical properties of the lipopolysaccharide of *Chromatium vinosum*. *Infect. Immun.*, 16 (3) :983-994.

226. **Hussain Qadri S. M., Burke A. Cunha, Yoshio Ueno *et al.*** (1995) Activity of cefepime against nosocomial blood culture isolates. *J. Antimicrob. Chemother.*, 36 (3) :531-536.

227. **Hussain Qadri S. M., Yoshio Ueno, Hishama Saldin *et al.*** (1993) *In vitro* activity of Ro 23-9424, a dual-acting cephalosporin-quinolone antimicrobial agent. *J. Clin. Pharmacol.*, 33 (10) :923-928.

228. **Hutsul J. A. y E. Worobec** (1997) Molecular characterization of the Serratia marcescens OmpF porin, and analysis of *S. marcescens* OmpF and OmpC osmoregulation. *Microbiology*, 143 (Pt 8) :2797-2806.

229. **Imtiaz U., E. K. Manavathu, S. Mobashery *et al.*** (1994) Reversal of clavulanate resistance conferred by a Ser-244 mutant of TEM-1 β-lactamase as a result of a second mutation (Arg to Ser at position 164) that enhances activity against ceftazidime. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 38 (5) :1134-1139.

230. **In-Ho Cha, Kyoung-Sook Kim, Sang-Hyun Kim *et al.*** (1996) Molecular Cloning and Expression of Shiga-Like Toxin II Gene (*slt-II*) from an Isolate of Healthy Korean Native Bovine Feces, *Escherichia coli* KSC109. *Jour. Microbiol.*, 34 (2) :151-157.

231. **Iravani A., C. A. Doyle, S. J. Durham *et al.*** (1992) Cefprozil versus cefaclor in the treatment of acute and uncomplicated urinary tract infections. Cefprozil Multicenter Study Group. *Clin. Ther.*, 14 (2) :314-326.

232. **Ishida H., H. Fuziwara, Y. Kaibori *et al.*** (1995) Cloning of multidrug resistance gene *pqrA* from *Proteus vulgaris*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39:453-457.

233. **Ishii Hiroko, Kenichi Sato, Kazuki Hoshino *et al.*** (1991) Active efflux of ofloxacin by a highly quinolone-resistant strain of *Proteus vulgaris*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 28:827-836.

234. **Ito T., K. Kojima, K. Koizumi *et al.*** (1994) Inhibitory activity on DNA gyrase and intracellular accumulation of quinolones: structure-activity relationship of Q-35 analogs. *Biol. Pharm. Bull.*, 17 (7) :927-930.

235. **Izard D., F. Gavini, D. Ochin *et al.*** (1980) Evaluation of Micro-ID, for identification of *Enterobacteriaceae. Pathol. Biol. (Paris)*, 28 (10) :681-684.

236. **Jacoberger B., G. Ubeaud, G. Freys *et al.*** (1998) Concentrations of pefloxacin in plasma and tissue after administration as surgical prophylaxis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42 (2) :425-427.

237. **Jacobs M. R.** (1995) Activity of quinolones against mycobacteria. *Drugs*, 49 (Supl 2) :67-75.

238. **Jacoby G. A. y I. Carreras** (1990) Activities of β-lactam antibiotics against *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum β-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 34 (5) :858-862.

239. **Jacoby George A. y L. Sutton** (1985) β-lactamases and β-lactam resistance in *Escherichia coli. Antimicrob. Agents Chemother.*, 28:703-705.

240. **Jarlier V., M. H. Nicolas, G. Fournier *et al.*** (1988) Extended broad-spectrum β-lactamases conferring transferable resistance to newer β-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev. Infect. Dis.*, 10 (4) :867-878.

241. **Johnson A. P., M. Warner, y T. Parsons** (1997) Activity of grepafloxacin against respiratory isolates of *Streptococcus pneumoniae. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 16 (8) :622-623.

242. **Jones M. E., M. R. Visser, M. Klootwijk *et al.*** (1999) Comparative activities of clinafloxacin, grepafloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, ofloxacin, sparfloxacin, and trovafloxacin and nonquinolones linozelid, quinupristin-dalfopristin, gentamicin, and vancomycin against clinical isolates of ciprofloxacin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43 (2) :421-423.

243. **Jones R. N.** (1990) Role of new cephamycins in the management of obstetric and gynecologic infections. *J. Reprod. Med.*, 35 (Supl 11) :1070-1077.

244. **Jones R. N.** (1991) Antimicrobial activity and spectrum of ceftibuten (7432-S, SCH 39720) -- a review of United States and Canadian results. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 14 (1) :37-43.

245. **Jones R. N.** (1995) Ceftibuten: a review of antimicrobial activity, spectrum and other microbiologic features. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 14 (Supl 7) :S77-S83.

246. **Jones R. N., M. A. Pfaller, G. V. Doern *et al.*** (1998) Antimicrobial activity and spectrum investigation of eight broad-spectrum β-lactam drugs: a 1997 surveillance trial in 102 medical centers in the United States. Cefepime Study Group. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 30 (3) :215-228.

247. **Jordan F. T., B. K. Horrocks, y R. Froyman** (1993) A model for testing the efficacy of enrofloxacin (Baytril) administered to turkey hens in the control of Mycoplasma iowae infection in eggs and embryos. *Avian. Dis.*, 37 (4) :1057-1061.

248. **Kampranis S. C. y A. Maxwell** (1998) Hydrolysis of ATP at only one GyrB subunit is sufficient to promote supercoiling by DNA gyrase. *J. Biol. Chem.*, 273 (41) :26305-26309.

249. **Kaneko M., A. Yamaguchi, y T. Sawai** (1984) Purification and characterization of two kinds of porins from the *Enterobacter cloacae* outer membrane. *J. Bacteriol.*, 158 (3) :1179-1181.

250. **Kayser F. H.** (1994) *In vitro* activity of cefpodoxime in comparison with other oral β-lactam antibiotics. *Infection*, 22 (5) :370-375.

251. **Kelly Niamh M., Mary H. MacDonald, Nancy Martin *et al.*** (1990) Comparison of the outer membrane protein and lipopolysaccharide profiles of mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa. J. Clin. Microbiol.*, 28 (9) :2017-2021.

252. **Kern W. V., B. Hay, P. Kern *et al.*** (1994) A randomized trial of roxithromycin in patients with acute leukemia and bone marrow transplant recipients receiving fluoroquinolone

prophylaxis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 38 (3) :465-472.

253. **Khac S. B. y N. J. Moreau** (1994) Interactions between fluoroquinolones, Mg2+, DNA and DNA gyrase, studied by phase partitioning in an aqueous two-phase system and by affinity chromatography. *J. Chromatogr. A.*, 668 (1) :241-247.

254. **Kim J. H., E. H. Cho, K. S. Kim *et al.*** (1998) Cloning and nucleotide sequence of the DNA gyrase *gyrA* gene from *Serratia marcescens* and characterization of mutations in *gyrA* of quinolone-resistant clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42 (1) :190-193.

255. **Kleinschmidt Jörg H.** (1999) Folding and Insertion of Membrane Proteins. Folding of b-barrel Membrane Proteins. *Internet,* http://www. people. Virginia. EDU/~jhk6n/Research_Overview. html URL: http://www. people. Virginia. EDU/~jhk6n/Research_Overview. html

256. **Kleinschmidt Jörg H. y Lukas K. Tamm** (1996) Folding Intermediates of a b-Barrel Membrane Protein. Kinetic Evidence for a Multi-Step Membrane Insertion Mechanism. *Biochemistry,* 35 (40) :12993-13000.

257. **Kliebe C., B. A. Nies, J. F. Meyer *et al.*** (1985) Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 28 (2) :302-307.

258. **Komatsu T., M. Ohta, N. Kido *et al.*** (1990) Molecular characterization of an *Enterobacter cloacae* gene (*romA*) which pleiotropically inhibits the expression of *Escherichia coli* outer membrane proteins. *J. Bacteriol.*, 172 (7) :4082-4089.

259. **Komatsu Takayuki, M. Ohta, N. Kido *et al.*** (1991) Increased resistance to multiple drugs by introduction of the *Enterobacter cloacae romA* gene into OmpF porin-deficient mutants of *Escherichia coli* K-12. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 35 (10) :2155-2158.

260. **Korolkovas Andrejus y Joseph H. Burckhalter** (1978) Compendio esencial de química farmacéutica. ¤ Ed. Reverté S. A., Barcelona.

261. **Kresken M., D. Hafner, H. Mittermayer *et al.*** (1994) Prevalence of fluoroquinolone resistance in Europe. *Infection,* 22 (Supl 2) :S90-S98.

262. **Krieg Noel R. y John G. Holt** (1984) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. *En la serie:* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Noel R. Krieg and John G. Holt (eds.) . Baltimore: Williams & Wilkins. 1ª ed., 6 Vols,

263. **Kumagai Yumi, Jun Ichi Kato, Kazuki Hoshino *et al.*** (1996) Quinolone-resistant mutants of *Escherichia coli* DNA topoisomerase IV *parC* gene. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40 (3) :710-714.

264. **Labia R., A. Morand, K. Tiwari *et al.*** (1988) The kinetics of SHV-2 plasmid-mediated β-lactamase compared to those of the parent enzyme from which it is derived. *Drugs Exp. Clin. Res.*, 14 (5) :335-339.

265. **Labia R., A. Thabaut, A. Morand *et al.*** (1989) The kinetics of CAZ-5, a novel SHV-related plasmid-mediated β- lactamase with enhanced hydrolytic activity against ceftazidime. *Drugs Exp. Clin. Res.*, 15 (11-12) :535-540.

266. **Laemmli U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature,* 227:680-685.

267. **Langan C. E., R. Cranfield, S. Breisch *et al.*** (1997) Randomized, double-blind study of grepafloxacin versus amoxycillin in patients with acute bacterial exacerbations of chronic bronchitis. *J. Antimicrob. Chemother.*, 40 (Supl A) :63-72.

268. **Lazzaroni M., B. P. Imbimbo, S. Bargiggia *et al.*** (1993) Effects of magnesium-aluminum hydroxide antacid on absorption of rufloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 37 (10) :2212-2216.

269. **Lee E. H., E. Collatz, I. Podglajen *et al.*** (1996) A *rob*-like gene of *Enterobacter cloacae* affecting porin synthesis and susceptibility to multiple antibiotics. *Antimicrob.*



Agents Chemother., 40 (9) :2029-2033.

270. **Lee E. H., E. Collatz, J. Trias *et al.*** (1992) Diffusion of β-lactam antibiotics into proteoliposomes reconstituted with outer membrane isogenic imipenem-susceptible and resistant strains of *Enterobacter cloacae*. *J. Gen. Microbiol.*, 138:2347-2351.

271. **León Serrano Javier y Juan María García Lobo** (1990) Manual de genética molecular. ¤ Editorial Síntesis, S. A., Madrid.

272. **Levy Stuart B.** (1992) Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 36 (4) :695-703.

273. **Lewis Kim** (1994) Multidrug resistance pumps in bacteria: variations on a theme. *TIBS*, 19:119-123.

274. **Li X. Z., D. Ma, D. M. Livermore *et al.*** (1994) Role of efflux pump (s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: active efflux as a contributing factor to β-lactam resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 38 (8) :1742-1752.

275. **Liao X. y Robert E. W. Hancock** (1997) Susceptibility to β-lactam antibiotics of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing penicillin-binding protein 3. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41 (5) :1158-1161.

276. **Ling T. K., E. Y. Liu, y A. F. Cheng** (1999) *In vitro* activity of trovafloxacin (CP 99,219), a new fluoroquinolone against hospital isolates. *Chemotherapy*, 45 (1) :22-27.

277. **Livermore D. M.** (1985) Do β-lactamases 'trap' cephalosporins? *J. Antimicrob. Chemother.*, 15 (5) :511-514.

278. **Livermore D. M.** (1987) 'Covalent trapping' and latamoxef resistance in β-lactamase derepressed Pseudomonas aeruginosa. *J. Antimicrob. Chemother.*, 20 (1) :7-13.

279. **Livermore D. M.** (1987) Clinical significance of β-lactamase induction and stable derepression in gram-negative rods. *Eur. J. Clin. Microbiol.*, 6 (4) :439-445.

280. **Livermore D. M.** (1987) Mechanisms of resistance to cephalosporin antibiotics. *Drugs*, 34 (Supl 2) :64-88.

281. **Livermore D. M.** (1989) Trapping and hydrolysis of latamoxef by β-lactamase in Pseudomonas aeruginosa [letter]. *J. Antimicrob. Chemother.*, 24 (5) :819-821.

282. **Livermore D. M.** (1995) Bacterial resistance to carbapenems. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 390:25-47.

283. **Livermore D. M.** (1995) β-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 8 (4) :557-584.

284. **Livermore D. M.** (1996) Are all β-lactams created equal? *Scand. J. Infect. Dis. Suppl*, 101:33-43.

285. **Livermore D. M., M. Akova, P. J. Wu *et al.*** (1989) Clavulanate and β-lactamase induction. *J. Antimicrob. Chemother.*, 24 (Supl B) :23-33.

286. **Livermore D. M. y H. Y. Chen** (1997) Potentiation of β-lactams against *Pseudomonas aeruginosa* strains by Ro 48-1256, a bridged monobactam inhibitor of AmpC β-lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.*, 40 (3) :335-343.

287. **Livermore D. M. y K. W. Davy** (1991) Invalidity for *Pseudomonas aeruginosa* of an accepted model of bacterial permeability to β-lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 5:916-921.

288. **Livermore David M. y T. L. Pitt** (1986) Dissociation of surface properties and "intrinsic" resistance to β-lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.*, 22 (3) :217-224.

289. **López-Brea M., T. Alarcón, M. Baquero *et al.*** (1990) Antimicrobial susceptibility of *Shigella* strains to new fluoroquinolones. *Rev. Esp. Quimioter.*, 3 (1) :83-85.

290. **Lucain Christine, P. Regamey, Francis Bellido *et al.*** (1989) Resistance emerging after pefloxacin therapy of experimental *Enterobacter cloacae* peritonitis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 33:937-943.

291. **Lugtenberg Ben, Jos Meijers, Roel Peters *et***

al. (1975) Electrophoretic resolution of the major outer membrane protein of *Escherichia coli* K12 into four bands. *FEBS Lett.*, 58 (1) :254-258.

292. **Ma Dzwokai, David N. Cook, Marie Alberti *et al.*** (1993) Molecular cloning and characterization of *acrA* and *acrE* genes of *Escherichia coli. J. Bacteriol.*, 175 (19) :6299-6313.

293. **Ma Dzwokai, David N. Cook, Marie Alberti *et al.*** (1995) Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli. Mol. Microbiol.*, 16 (1) :45-55.

294. **Mainardi J. L., P. Mugnier, A. Coutrot *et al.*** (1997) Carbapenem resistance in a clinical isolate of *Citrobacter freundii. Antimicrob. Agents Chemother.*, 41 (11) :2352-2354.

295. **Maiti S. N., O. A. Phillips, R. G. Micetich *et al.*** (1998) Beta-lactamase inhibitors: agents to overcome bacterial resistance. *Curr. Med. Chem.*, 5 (6) :441-456.

296. **Mallea M., J. Chevalier, C. Bornet *et al.*** (1998) Porin alteration and active efflux: two *in vivo* drug resistance strategies used by *Enterobacter aerogenes. Microbiology,* 144:3003-3009.

297. **Mandell W. F. y H. Neu** (1989) The quinolone antibiotics. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 2:357-361.

298. **Maneewannakul Kesmanee y Stuart B. Levy** (1996) Identification of *mar* mutants among quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli. Antimicrob. Agents Chemother.*, 40 (7) :1695-1698.

299. **Marchou Bruno, Francis Bellido, Robert Charnas *et al.*** (1987) Contribution of β-lactamase hydrolysis and outer membrane permeability to ceftriaxone resistance in *Enterobacter cloacae. Antimicrob. Agents Chemother.*, 31 (10) :1589-1595.

300. **Markiewicz Z., J. Baj, y M. Wlodarczyk** (1985) Penicillin-binding proteins of Thiobacillus versutus. *Acta Microbiol. Pol.*, 34 (2) :103-110.

301. **Marshall Neil J. y Laura J. V. Piddock** (1997) Antibacterial efflux systems. *Microbiología SEM,* 13 (3) :285-300.

302. **Martindale** (1996) *En*: J. E. F. Reynolds, ed.: The extra pharmacopoeia. ¤ The Pharmaceutical Press. pp 130-297, London.

303. **Martínez-Beltrán J., C. Calderón, M. Paz Sierra *et al.*** (1997) Actividad *in vitro* de los carbapenémicos frente a *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas aeruginosa* hiperproductoras de betalactamasas cromosómicas del grupo 1. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, (supl 19) :20-26.

304. **Martínez-Flores I., R. Cano, V. H. Bustamante *et al.*** (1999) The *ompB* operon partially determines differential expression of OmpC in *Salmonella typhi* and *Escherichia coli. J. Bacteriol.*, 181 (2) :556-562.

305. **Martínez-Martínez L., I. García, S. Ballesta *et al.*** (1998) Energy-dependent accumulation of fluoroquinolones in quinolone-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains [erratas publicadas en *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1998, 42 (10) :2772]. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42 (7) :1850-1852.

306. **Martínez-Martínez Luis, Santiago Hernández-Allés, Sebastián Albertí *et al.*** (1996) *In vivo* selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40 (2) :342-348.

307. **Martínez-Martínez Luis, A. Pascual, Santiago Hernández-Allés *et al.*** (1999) Roles of β-lactamases and porins in activities of carbapenems and cephalosporins against *Klebsiella pneumoniae. Antimicrob. Agents Chemother.*, 43 (7) :1669-1673.

308. **Masecar Barbara L. y Norman J. Robillard** (1991) Spontaneous quinolone resistance in *Serratia marcescens* due to a mutation in *gyrA. Antimicrob. Agents Chemother.*, 35 (5) :898-902.

309. **Maskell J. P.** (1991) The resolution of bacteroides lipopolysaccharides by polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Med. Microbiol.*,

34:253-257.

310. **Matsubara M. y T. Mizuno** (1999) EnvZ-independent phosphotransfer signaling pathway of the OmpR-mediated osmoregulatory expression of OmpC and OmpF in *Escherichia coli. Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63 (2) :408-414.

311. **Maxwell Anthony** (1997) DNA gyrase as a drug target. *Trends Microbiol.*, 5:102-108.

312. **Maxwell Anthony y Martin Gellert** (1984) The DNA dependence of the ATPase activity of DNA gyrase. *J. Biol. Chem.*, 259 (23) :14472-14480.

313. **Mayer I. y E. Nagy** (1999) Investigation of the synergic effects of aminoglycoside-fluoroquinolone and third-generation cephalosporin combinations against clinical isolates of *Pseudomonas* spp. *J. Antimicrob. Chemother.*, 43 (5) :651-657.

314. **McCaffrey C., A. Bertasso, J. Pace *et al.*** (1992) Quinolone accumulation in *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa* , and *Staphylococcus aureus. Antimicrob. Agents Chemother.*, 36 (8) :1601-1605.

315. **Medeiros A. A.** (1997) Evolution and dissemination of β-lactamases accelerated by generations of β-lactam antibiotics. *Clin. Infect. Dis.*, 24 (Supl 1) :S19-S45.

316. **Medeiros A. A., T. F. O'Brien, E. Y. Rosenberg *et al.*** (1987) Loss of OmpC porin in a strain of *Salmonella typhimurium* increased resistance to cephalosporins during therapy. *J. Infect. Dis.*, 156:751-757.

317. **Méndez García J.** (1996) Metabolismo y genética bacteriana. *En*: José Ángel García-Rodríguez y Juan J. Picazo, eds. : Microbiología Médica: 1. Microbiología Médica General. ¤ Madrid, Madrid. 2 Vols, Vol 1°, (Cap4) :53-71.

318. **Michea-Hamzehpour M., A. Kahr, y J. C. Pechère** (1994) *In vitro* stepwise selection of resistance to quinolones, β-lactams and amikacin in nosocomial gram-negative bacilli. *Infection,* 22 (Supl 2) :S105-S110.

319. **Michel-Briand Y., T. Nicolas, C. Godard *et al.*** (1992) β-lactamase id of ceftazidime resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Microbiologica,* 15:65-70.

320. **Michéa-Hamzehpour Mehri** (1987) Reistance occurring. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 11:1803-1808.

321. **Miller P. F., L. F. Gambino, M. C. Sulavik *et al.*** (1994) Genetic relationship between *soxRS* and *mar* loci in pormoting multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli. Antimicrob. Agents Chemother.*, 38:1773-1779.

322. **Misra R. y S. A. Benson** (1989) A novel mutation, *cog*, which results in production of a new porin protein (OmpG) of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, 171 (8) :4105-4111.

323. **Mitsuyama Junichi, Ryoichi Hiruma, Akihito Yamaguchi *et al.*** (1987) Identification of porins in outer membrane of *Proteus, Morganella*, and *Providencia* spp. and their role in outer membrane permeation of β-lactams. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 31 (3) :379-384.

324. **Mitsuyama Junichi, Yuko Itoh, Masahiro Takahata *et al.*** (1992) *In vitro* antibacterial activities of tosufloxacin against and uptake of tosufloxacin by outer membrane mutants of *Escherichia coli, Proteus mirabilis,* and *Salmonella typhimurium. Antimicrob. Agents Chemother.*, 36 (9) :2030-2036.

325. **Molavi A.** (1991) Cephalosporins: rationale for clinical use. *Am. Fam. Physician,* 43 (3) :937-948.

326. **Moniot-Ville N., J. Guibert, N. Moreau *et al.*** (1991) Mechanisms of quinolone resistance in a clinical isolate of *Escherichia coli* highly resistant to fluoroquinolones but susceptible to nalidixic acid. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 35 (3) :519-523.

327. **Monnaie D., R. Virden, y J. M. Frere** (1992) A rapid-kinetic study of the class C β-lactamase of *Enterobacter cloacae* 908R. *FEBS Lett.*, 306 (2-3) :108-112.

328. **Morita Y., K. Kodama, S. Shiota *et al.*** (1998)

NorM, a putative multidrug efflux protein, of *Vibrio parahaemolyticus* and its homolog in *Escherichia coli. Antimicrob. Agents Chemother.*, 42 (7) :1778-1782.

329. **Mortimer Peter G. S. y Laura J. V. Piddock** (1993) The accumulation of five antibacterial agents in porin-deficient mutants of *Escherichia coli. J. Antimicrob. Chemother.*, 32 (2) :195-213.

330. **Muñoz Bellido J. L., M. Alonso Manzanares, J. A. Martínez Andrés *et al.*** (1999) Efflux pump-mediated quinolone resistance in *Staphylococcus aureus* strains wild type for *gyrA*, *gyrB*, *grlA*, and *norA*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43 (2) :354-356.

331. **Muñoz R. y A. G. de la Campa** (1996) ParC subunit of DNA topoisomerase IV of *Streptococcus pneumoniae* is a primary target of fluoroquinolones and cooperates with DNA gyrase A subunit in forming resistance phenotype. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40 (10) :2252-2257.

332. **Muratani Tetsuro, Matsuhisa Inoue, y Mitsuhashi Susumu** (1992) *In vitro* activity of T-3761, a new fluoroquinolone. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 36 (10) :2293-2303.

333. **Murray Patrick R., George S. Kobayasi, Michael A. Pfaller *et al.*** (1997) Microbiología Médica. 2ª ed. ¤ Harcourt Brace, Madrid.

334. **Nagy E., Z. Pragai, Z. Koczian *et al.*** (1998) Investigation of the presence of different broad-spectrum β-lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriacae. Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, 45 (3-4) :433-446.

335. **Nakamura Shinichi, Mika Nakamura, Tsuyoshi Kojima *et al.*** (1989) *gyrA* and *gyrB* mutations in quinolone-resistant strains of *Escherichia coli. Antimicrob. Agents Chemother.*, 33 (2) :254-255.

336. **National Committee for Clinical Laboratory Standards** (1997) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A4. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards. 4ª ed.,

337. **National Committee for Clinical Laboratory Standards** (1997) Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard M2-A6. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards. 6ª ed.

338. **Neu H. C.** (1992) An update on fluoroquinolones. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 5:755-763.

339. **Neumann S. y A. Quiñones** (1997) Discoordinate gene expression of *gyrA* and *gyrB* in response to DNA gyrase inhibition in *Escherichia coli. J. Basic Microbiol.*, 37 (1) :53-69.

340. **Nguyen Van J. C. y L. Gutmann** (1994) Résistance aux antibiotiques par diminution de la perméabilité chez les bactéries à gram négatif. *Presse Med.*, 23 (11) :522-531.

341. **Nicholas R. A. y J. L. Strominger** (1988) Relations between β-lactamases and penicillin-binding proteins: β-lactamase activity of penicillin-binding protein 5 from *Escherichia coli. Rev. Infect. Dis.*, 10 (4) :733-738.

342. **Nikaido H.** (1992) Porins and specific channels of bacterial outer membranes. *Mol. Microbiol.*, 6 (4) :435-442.

343. **Nikaido H., M. Basina, V. Nguyen *et al.*** (1998) Multidrug efflux pump AcrAB of *Salmonella typhimurium* excretes only those β-lactam antibiotics containing lipophilic side chains. *J. Bacteriol.*, 180 (17) :4686-4692.

344. **Nikaido Hiroshi** (1989) Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 33 (11) :1831-1836.

345. **Nikaido Hiroshi** (1994) Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barriers and active efflux. *Science,* 264:382-388.

346. **Nikaido Hiroshi** (1996) Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.*, 178 (20) :5853-5859.

347. **Nikaido Hiroshi y S. Normark** (1987) Sensi-

tivity of *Escherichia coli* to various β-lactams is determined by the interplay of outer membrane permeability and degradation by periplasmic β-lactamases: a quantitative predective treatment. *Mol. Microbiol.*, 1:29-36.

348. **Nikaido Hiroshi y David G. Thanassi** (1993) Penetration of lipophilic agents with multiple protonation sites into bacterial cells: tetracyclines and fluoroquinolones as examples. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 37 (7) :1393-1399.

349. **Nikaido Hiroshi y Marti Vaara** (1985) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.*, 49 (1) :1-32.

350. **Nishino Y., T. Deguchi, M. Yasuda *et al.*** (1997) Mutations in the *gyrA* and *parC* genes associated with fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Citrobacter freundii* . *FEMS Microbiol. Lett.*, 154 (2) :409-414.

351. **Nord C. E., A. Lindmark, y I. Persson** (1993) *In vitro* activity of the new quinolone BAY y 3118 against anaerobic bacteria. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 12 (8) :640-642.

352. **Nukaga M., S. Haruta, K. Tanimoto *et al.*** (1995) Molecular evolution of a class C β-lactamase extending its substrate specificity [erratas publicadas en *J. Biol. Chem.* 1995, 270 (36) :21428]. *J. Biol. Chem.*, 270 (11) :5729-5735.

353. **O'Callaghan C. H.** (1979) Description and classification of the newer cephalosporins and their relationships with the established compounds. *J. Antimicrob. Chemother.*, 5 (6) :635-671.

354. **Oethinger M., W. V. Kern, J. D. Goldman *et al.*** (1998) Association of organic solvent tolerance and fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli. J. Antimicrob. Chemother.*, 41 (1) :111-114.

355. **Oethinger M., I. Podglajen, W. V. Kern *et al.*** (1998) Overexpression of the *marA* or *soxS* regulatory gene in clinical topoisomerase mutants of *Escherichia coli. Antimicrob. Agents Chemother.*, 42 (8) :2089-2094.

356. **Okamoto M. P., R. K. Nakahiro, A. Chin *et al.*** (1994) Cefepime: a new fourth-generation cephalosporin. *Am. J. Hosp. Pharm.*, 51 (4) :463-477.

357. **Okusu Haruko, Dzwokai Ma, y Hiroshi Nikaido** (1996) AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple antibiotic resistance (Mar) mutants. *J. Bacteriol.*, 178 (1) :306-308.

358. **Omoto S. y S. Watanabe** (1990) Efficacy of cefminox in the treatment of bacterial infections. *Int. J. Clin. Pharmacol. Res.*, 10 (6) :361-368.

359. **Oram Mark y L. Mark Fisher** (1991) 4-Quinolone resistance mutations in the DNA gyrase of *Escherichia coli* clinical isolates identified by using the polymerase chain reaction. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 35 (2) :387-389.

360. **Orci B. A. y K. K. Tripton** (1980) Kinetic analysis of progress curves. *Methods Enzymol.*, 43:69-85.

361. **Oropeza R., C. L. Sampieri, J. L. Puente *et al.*** (1999) Negative and positive regulation of the non-osmoregulated *ompS1* porin gene in *Salmonella typhi*: a novel regulatory mechanism that involves OmpR. *Mol. Microbiol.*, 32 (2) :243-252.

362. **Orskov Frits** (1984) Facultatively Anaerobic Gram-Negative Rods: Genus I. *Escherichia. En*: Noel R. Krieg y John G. Holt, eds. : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Vol 1) . 1ª ed. ¤ Williams & Wilkins, Baltimore. 6 Vols, Vol 1°, (Cap5) :420-459.

363. **Orskov Ida** (1984) Facultatively Anaerobic Gram-Negative Rods: Genus V. *Klebsiella. En*: Noel R. Krieg y John G. Holt, eds. : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Vol 1) . 1ª ed. ¤ Williams & Wilkins, Baltimore. 6 Vols, Vol 1°, (Cap5) :461-465.

364. **Pagani L., R. Migliavacca, F. Luzzaro *et al.*** (1998) Comparative activity of piperacillin/tazobactam against clinical isolates of extended-spectrum β-lactamase-producing *Enterobacteriaceae. Chemotherapy,* 44 (6)

:377-384.

365. **Palumbo M., B. Gatto, G. Zagotto *et al.*** (1993) On the mechanism of action of quinolone drugs. *Trends Microbiol.*, 1 (6) :232-235.

366. **Pan X. S., J. Ambler, S. Mehtar *et al.*** (1996) Involvement of topoisomerase IV and DNA gyrase as ciprofloxacin targets in *Streptococcus pneumoniae. Antimicrob. Agents Chemother.*, 40 (10) :2321-2326.

367. **Pan X. S. y L. M. Fisher** (1997) Targeting of DNA gyrase in *Streptococcus pneumoniae* by sparfloxacin: selective targeting of gyrase or topoisomerase IV by quinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41 (2) :471-474.

368. **Pan X. S. y L. M. Fisher** (1998) DNA gyrase and topoisomerase IV are dual targets of clinafloxacin action in *Streptococcus pneumoniae. Antimicrob. Agents Chemother.*, 42 (11) :2810-2816.

369. **Park Y. H., J. H. Yoo, D. H. Huh *et al.*** (1998) Molecular analysis of fluoroquinolone-resistance in *Escherichia coli* on the aspect of gyrase and multiple antibiotic resistance (*mar*) genes. *Yonsei Med. J.*, 39 (6) :534-540.

370. **Paulsen Ian T., Melissa H. Brown, y Ronald A. Skurray** (1996) Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol. Rev.*, 60 (4) :575-608.

371. **Pautsch A. y G. E. Schulz** (1998) Structure of the outer membrane protein A transmembrane domain. *Nat. Struct. Biol.*, 5 (11) :1013-1017.

372. **Pautsch A., J. Vogt, K. Model *et al.*** (1999) Strategy for membrane protein crystallization exemplified with OmpA and OmpX. *Proteins*, 34 (2) :167-172.

373. **Pechère J. C.** (1991) Why are carbapenems active against *Enterobacter cloacae* resistant to third generation cephalosporins? *Scand. J. Infect. Dis. Suppl*, 78:17-21.

374. **Penner John L.** (1984) Facultatively Anaerobic Gram-Negative Rods: Genus XI. *Proteus. En*: Noel R. Krieg y John G. Holt, eds. : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Vol 1) . 1ª ed. ¤ Williams & Wilkins, Baltimore. 6 Vols, Vol 1°, (Cap5) :491-494.

375. **Perea E. J. y L. Martínez-Martínez** (1997) Actividad de cefepima frente a enterobacterias productoras de betalactamasas. *Rev. Esp. Quimioter.*, 10 (Supl 4) :19-24.

376. **Perilli Mariagrazia, Nicola Franceschini, G. Bonfiglio *et al.*** (1999) A kinetic study of the interaction between tazobactam (a penicillanic acid sulphone derivate) and active site serine β-lactamases. *J. Enzym. Inhib.*, 1-10.

377. **Pernet A. G.** (1991) Temafloxacin: a safe antibiotic for the ederly, patients with comorbidities, and other special populations. *Am. J. Med.*, 91 (Supl 6A) :S163-S165.

378. **Perry C. M. y R. N. Brogden** (1996) Cefuroxime axetil. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs*, 52 (1) :125-158.

379. **Peterson Arnold A. y Estelle J. McGroarty** (1985) High molecular weight components in lipopolysaccharides of *Salmonella typhimurium*, *Salmonella minnesota* and *Escherichia coli. J. Bacteriol.*, 162 (2) :738-745.

380. **Pérez-Trallero E., M. Urbieta, D. Jiménez *et al.*** (1993) Ten-year survey of quinolone resistance in *Escherichia coli* causing urinary tract infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 12:349-351.

381. **Picard M. y F. Malouin** (1992) Molecular basis of the efficacy of cefaclor against *Haemophilus influenzae. Antimicrob. Agents Chemother.*, 36 (11) :2569-2572.

382. **Piddock L. J. y Y. F. Jin** (1999) Antimicrobial activity and accumulation of moxifloxacin in quinolone-susceptible bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.*, 43 (Supl B) :39-42.

383. **Piddock L. J., Y. F. Jin, V. Ricci *et al.*** (1999) Quinolone accumulation by *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli. J. Antimicrob. Chemother.*, 43 (1) :61-70.

384. **Piddock L. J., V. Ricci, I. McLaren *et al.***

(1998) Role of mutation in the *gyrA* and *parC* genes of nalidixic-acid-resistant *Salmonella* serotypes isolated from animals in the United Kingdom. *J. Antimicrob. Chemother.*, 41 (6) :635-641.

385. **Piddock Laura J. V.** (1995) Mechanisms of resistance to fluoroquinolones: State-of-the-art 1992-1994. *Drugs*, 49 (Supl 2) :29-35.

386. **Piddock Laura J. V., D. J. Griggs, M. C. Hall *et al.*** (1993) Ciprofloxacin resistance in clinical isolates of *Salmonella typhimurium* obtained from two patients. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 37:662-666.

387. **Piddock Laura J. V., M. C. Hall, y R. N. Walters** (1991) Phenotypic characterization of quinolone-resistant mutants of *Enterobacteriaceae* selected from wild type, *gyrA* type and multiply-resistant (*marA*) type strains. *J. Antimicrob. Chemother.*, 28:185-198.

388. **Piddock Laura J. V. y Ruth N. Walters** (1992) Bactericidal activities of five quinolones for *Escherichia coli* strains with mutations in genes encoding the SOS response or cell division. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 36 (4) :819-825.

389. **Pitout J. D., K. S. Thomson, N. D. Hanson *et al.*** (1998) β-lactamases responsible for resistance to expanded-spectrum cephalosporins in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* isolates recovered in South Africa. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42 (6) :1350-1354.

390. **Power E. G. y I. Phillips** (1993) Correlation between *umuC* induction and *Salmonella* mutagenicity assay for quinolone antimicrobial agents. *FEMS Microbiol. Lett.*, 112 (3) :251-254.

391. **Prats G. y P. Coll** (1996) Géneros *Shigella*, *Salmonella* y *Yersinia*. *En*: Microbiología Médica General. 1ª ed. ¤ Mosby/Doyma Libros, Madrid. 2 Vols, Vol 1°, (Cap15) :239-252.

392. **Prats G. y B. Mirelis** (1996) Enterobacterias. Características generales. Enterobacterias oportunistas. *Escherichia coli*. *En*: Microbiología Médica General. 1ª ed. ¤ Mosby/Doyma Libros, Madrid. 2 Vols, Vol 1°, (Cap14) :223-237.

393. **Prescott Lansing M., John P. Harley, y Donald A. Klein** (1993) Procaryotic cell structure and function. *En*: Microbiology, second edition. 2ª ed. ¤ Wm. C. Brown Communications, Inc., Dubuque, IA., (Cap3) :40-68.

394. **Prescott Lansing M., John P. Harley, y Donald A. Klein** (1993) Symbiotic associations: parasitism, pathogenicity, and resistance. *En*: Microbiology, second edition. 2ª ed. ¤ Wm. C. Brown Communications, Inc., Dubuque, IA., (Cap30) :578-603.

395. **Pucci M. J., J. Boice-Sowek, R. E. Kessler *et al.*** (1991) Comparison of cefepime, cefpirome, and cefaclidine binding affinities for penicillin-binding proteins in *Escherichia coli* K-12 and *Pseudomonas aeruginosa* SC8329. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 35 (11) :2312-2317.

396. **Pumarola A.** (1991) Relación huésped-bacteria (IV) . *En*: A. Pumarola, A. Rodríguez-Torres, J. A. García-Rodríguez *et al*, eds. : Microbiología y parasitología médica. (Cap16) :178-188.

397. **Rahaman S. O., J. Mukherjee, A. Chakrabarti *et al.*** (1998) Decreased membrane permeability in a polymyxin B-resistant *Escherichia coli* mutant exhibiting multiple resistance to β-lactams as well as aminoglycosides. *FEMS Microbiol. Lett.*, 161 (2) :249-254.

398. **Raimondi A., A. Traverso, y Hiroshi Nikaido** (1991) Imipenem and Meropenem-resistant mutants of *Enterobacter cloacae* and *Proteus rettgeri* lack porins. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 35:1174-1180.

399. **Rasmussen B. A., K. Bush, D. Keeney *et al.*** (1996) Characterization of IMI-1 β-lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40 (9) :2080-2086.

400. **Rasmussen B. A., K. Bush, y F. P. Tally** (1997) Antimicrobial resistance in anaerobes.

Clin. Infect. Dis., 24 (Supl 1) :S110-S120.

401. **Reese Richard E. y Robert F. Betts** (1991) El uso de los antibióticos. *En*: Richard E. Reese y Robert F. Betts, eds. : Un planteamiento práctico de las enfermedades infecciosas. ¤ Jarpyo Editores, S. A., Madrid. Vol 3°, (Cap28) :907-1117.

402. **Reeves D. S., M. J. Bywater, y H. A. Holt** (1993) The activity of cefpirome and ten other antibacterial agents against 2858 clinical isolates collected from 20 centres. *J. Antimicrob. Chemother.*, 31 (3) :345-362.

403. **Reiss R., O. Landau, A. A. Deutsch *et al.*** (1992) Sensitivity to new generation of antibiotics in biliary surgery. *Int. Surg.*, 77 (2) :96-98.

404. **Reyna F., M. Huesca, V. González *et al.*** (1995) *Salmonella typhimurium gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39:1621-1623.

405. **Rice L. B., L. L. Carias, L. Etter *et al.*** (1993) Resistance to cefoperazone-sulbactam in *Klebsiella pneumoniae*: evidence for enhanced resistance resulting from the coexistence of two different resistance mechanisms. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 37:1061-1064.

406. **Richard C.** (1984) Facultatively Anaerobic Gram-Negative Rods: Genus VI. *Enterobacter. En*: Noel R. Krieg y John G. Holt, eds. : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Vol 1) . 1ª ed. ¤ Williams & Wilkins, Baltimore. 6 Vols, Vol 1°, (Cap5) :465-469.

407. **Richard P., M. H. Delangle, D. Merrien *et al.*** (1994) Fluoroquinolone use and fluoroquinolone resistance: is there an association? *Clin. Infect. Dis.*, 19 (1) :54-59.

408. **Robillard Norman J. y A. L. Scarpa** (1988) Genetic and physiological characterisation of ciprofloxacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 32:535-539.

409. **Roblin P. M., A. Kutlin, T. Reznik *et al.*** (1999) Activity of grepafloxacin and other fluoroquinones and newer macrolides against recent clinical isolates of Chlamydia pneumoniae [In Process Citation]. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 12 (2) :181-184.

410. **Rogers Howard J.** (1983) Bacterial cell structure. *En la serie:* Aspects of Microbiology. J. A. Cole, C. J. Knowles, and D. Schlessinger (eds.) . Washington, D. C. : American Society for Microbiology. Vol 6°

411. **Rosin E., T. S. Uphoff, N. J. Schultz-Darken *et al.*** (1993) Cefazolin antibacterial activity and concentrations in serum and the surgical wound in dogs. *Am. J. Vet. Res.*, 54 (8) :1317-1321.

412. **Ruiz Tovar M., A. Ruiz Bremón, B. Pérez Gorricho *et al.*** (1998) Distribución geográfica y características de la evolución del consumo extrahospitalario de quinolonas en España y por provincias (1985-1993) . *Rev. Esp. Quimioter.*, 11 (1) :58-63.

413. **Ruiz Joaquim, Silvia Casellas, M. Teresa Jiménez de Anta *et al.*** (1997) The region of the *parE* gene, homologous to the quinolone-resistant determining region of the *gyrB* gene, is not linked with the acquisition of quinolone resistance in *Escherichia coli* clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother.*, 39 (6) :839-840.

414. **Ruiz Joaquim, D. Castro, Pilar Goñi *et al.*** (1997) Analysis of the mechanism of quinolone resistance in nalidixic acid-resistant clinical isolates of *Salmonella* serotype Typhimurium. *J. Med. Microbiol.*, 46 (7) :623-628.

415. **Sader H. S., R. N. Jones, S. D. Allen *et al.*** (1993) *In vitro* comparison activity of OPC-17116, a new fluoroquinolone, against more than 5,000 recent clinical isolates from five medical centers. *J. Chemother.*, 5 (5) :283-288.

416. **Sader H. S., R. N. Jones, J. A. Washington *et al.*** (1993) *In vitro* activity of cefpodoxime compared with other oral cephalosporins tested against 5556 recent clinical isolates from five medical centers. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 17 (2) :143-150.

417. **Sader H. S., C. M. Mendes, A. Montelli *et al.***

(1998) [*In vitro* antimicrobial activity of cefpirome compared to other broad-spectrum β-lactam drugs against 804 clinical isolates from 9 Brazilian hospitals]. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, 44 (4) :283-288.

418. **Saiki A. Y., L. L. Shen, C. M. Chen *et al.*** (1999) DNA cleavage activities of *Staphylococcus aureus* gyrase and topoisomerase IV stimulated by quinolones and 2-pyridones. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43 (7) :1574-1577.

419. **Sakazaki Riichi** (1984) Facultatively Anaerobic Gram-Negative Rods: Genus IV. *Citrobacter. En*: Noel R. Krieg y John G. Holt, eds. : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Vol 1) . 1ª ed. ¤ Williams & Wilkins, Baltimore. 6 Vols, Vol 1°, (Cap5) :458-461.

420. **Sakurai M., Y. Sugimura, K. Arima *et al.*** (1994) [Study on clinical effects of tosufloxacin (TFLX) and the long-term low dose therapy for the prophylaxis of recurrent urinary tract infection]. *Hinyokika. Kiyo.*, 40 (3) :279-284.

421. **Sallmann F. R., S. Baveye-Descamps, F. Pattus *et al.*** (1999) Porins OmpC and PhoE of *Escherichia coli* as specific cell-surface targets of human lactoferrin. Binding characteristics and biological effects. *J. Biol. Chem.*, 274 (23) :16107-16114.

422. **Salmon S. A., J. L. Watts, F. M. Aarestrup *et al.*** (1998) Minimum inhibitory concentrations for selected antimicrobial agents against organisms isolated from the mammary glands of dairy heifers in New Zealand and Denmark. *J. Dairy Sci.*, 81 (2) :570-578.

423. **Samartzidou H. y A. H. Delcour** (1998) *E. coli* PhoE porin has an opposite voltage-dependence to the homologous OmpF. *EMBO J.*, 17 (1) :93-100.

424. **Samartzidou H. y A. H. Delcour** (1999) Excretion of endogenous cadaverine leads to a decrease in porin-mediated outer membrane permeability. *J. Bacteriol.*, 181 (3) :791-798.

425. **Sanders C. C.** (1983) Novel resistance selected by the new expanded-spectrum cephalosporins: a concern. *J. Infect. Dis.*, 147 (3) :585-589.

426. **Sanders C. C., P. A. Bradford, A. F. Ehrhardt *et al.*** (1997) Penicillin-binding proteins and induction of AmpC β-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41 (9) :2013-2015.

427. **Sanders C. C. y W. E. Sanders, Jr.** (1985) Microbial resistance to newer generation β-lactam antibiotics: clinical and laboratory implications. *J. Infect. Dis.*, 151 (3) :399-406.

428. **Sanders Christine C., W. Eugene Sanders (Jr) , Richard V. Goering *et al.*** (1984) Selection of multiple antibiotic resistance by quinolones, β-lactams, and aminoglycosides with special references to cross-resistance between unrelated drug classes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 26 (6) :797-801.

429. **Sawae Y., K. Okada, y Y. Kumagai** (1985) [Laboratory and clinical studies on cefminox]. *Jpn. J. Antibiot.*, 38 (5) :1155-1164.

430. **Sawai Tetsuo, Ryoichi Hiruma, Nobuko Kawana *et al.*** (1982) Outer membrane permeation of β-lactam antibiotics in *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, and *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 22:585-592.

431. **Schabert Frank A., Christian Henn, y Andreas Engel** (1995) Native *Escherichia coli* OmpF porin surfaces probed by the Atomic Force Microscope. *Science*, 268:92-94.

432. **Schatz B. S., K. T. Karavokiros, M. A. Taeubel *et al.*** (1996) Comparison of cefprozil, cefpodoxime proxetil, loracarbef, cefixime, and ceftibuten. *Ann. Pharmacother.*, 30 (3) :258-268.

433. **Schedletzky H., B. Wiedemann, y P. Heisig** (1999) The effect of moxifloxacin on its target topoisomerases from *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 43 (Supl B) :31-37.

434. **Schentag J. J.** (1991) Cefmetazole sodium: pharmacology, pharmacokinetics, and clinical

trials. *Pharmacotherapy,* 11 (1) :2-19.

435. **Schonheyder K. T., K. T. Jensen, y W. Fredericksen** (1994) Taxonomic notes: Synonymy of *Enterobacter cancerogenus* (Urosevic 1966) Dickey and Zumoff 1988 and *Enterobacter taylorae* Farmer et al. 1985 and resolution of an ambiguity in the biochemical profile. *Int. J. Syst. Bacteriol.,* 44:586-587.

436. **Shlaes D. M., B. Binczewski, y L. B. Rice** (1993) Emerging antimicrobial resistance and the immunocompromised host. *Clin. Infect. Dis.,* 17 (Supl 2) :S527-S536.

437. **Simonet M., J. L. Herrmann, y M. Veron** (1990) [Activity of cefuroxime against bacterial strains isolated from acute otitis media]. *Pathol Biol. (Paris)*, 38 (5) :355-357.

438. **Singh M., M. A. Chaudhry, J. N. Yadava *et al.*** (1992) The spectrum of antibiotic resistance in human and veterinary isolates of *Escherichia coli* collected from 1984-86 in northern India. *J. Antimicrob. Chemother.,* 29 (2) :159-168.

439. **Soussy C. J., M. Chanal, E. Derlot *et al.*** (1994) [*In vitro* antibacterial activity of cefpirome: a new cephalosporin; results of a multicenter study]. *Pathol Biol. (Paris)*, 42 (8) :754-760.

440. **Soussy C. J., J. S. Wolfson, E. Y. Ng *et al.*** (1993) Limitations of plasmid complementation test for determination of quinolone resistance due to changes in the gyrase A protein and identification of conditional quinolone resistance locus. *Antimicrob. Agents Chemother.,* 37:2588-2592.

441. **Srikumar R., T. Kon, N. Gotoh *et al.*** (1998) Expression of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps MexA-MexB-OprM and MexC-MexD-OprJ in a multidrug-sensitive *Escherichia coli* strain. *Antimicrob. Agents Chemother.,* 42 (1) :65-71.

442. **Stahlmann R. y R. Schwabe** (1997) Safety profile of grepafloxacin compared with other fluoroquinolones. *J. Antimicrob. Chemother.,* 40 (Supl A) :83-92.

443. **Stanier R. Y., J. L. Ingraham, M. L. Wheelis *et al.*** (1991) Microbiología. 2ª ed. ¤ Edit. Reverté,

444. **Stapleton P., K. Shannon, y I. Phillips** (1995) The ability of β-lactam antibiotics to select mutants with derepressed β-lactamase synthesis from *Citrobacter freundii. J. Antimicrob. Chemother.,* 36 (3) :483-496.

445. **Stefani S., M. B. Pellegrino, G. D'Amico *et al.*** (1992) *In vitro* activity of a new broad-spectrum, β-lactamase-stable oral cephalosporin, cefixime, in comparison with other drugs, against *Haemophilus influenzae, Haemophilus parainfluenzae, Moraxella catarrhalis* and *Streptococcus pneumoniae. Chemotherapy,* 38 (1) :36-45.

446. **Sugawara E. y H. Nikaido** (1992) Pore-forming activity of OmpA protein of *Escherichia coli. J. Biol. Chem.,* 267 (4) :2507-2511.

447. **Sugawara E. y H. Nikaido** (1994) OmpA protein of *Escherichia coli* outer membrane occurs in open and closed channel forms. *J. Biol. Chem.,* 269 (27) :17981-17987.

448. **Sutcliffe Joyce A., Thomas D. Gootz, y John F. Barrett** (1989) Biochemical characteristics and physiological significance of major DNA topoisomerases. *Antimicrob. Agents Chemother.,* 33 (12) :2027-2033.

449. **Tanabe K., T. Kondo, Y. Onodera *et al.*** (1999) A conspicuous adaptability to antibiotics in the *Escherichia coli* mutator strain, dnaQ49. *FEMS Microbiol. Lett.,* 176 (1) :191-196.

450. **Tatsis G., G. Tsoukalas, V. Hatzinikolaou *et al.*** (1996) Clinical and microbiological evaluation of pefloxacin in lower respiratory tract infections. *J. Int. Med. Res.,* 24 (6) :478-481.

451. **Tavío Pérez María del Mar y Zoilo González Lama** (1990) Inducción *in vitro* de resistencia a cefalosporinas de tercera generación. *Rev. Esp. Quimioter.,* 344-348.

452. **Tavío Pérez María del Mar y Zoilo González Lama** (1991) Dos tipos diferentes de multirresistencia en cepas de *E. coli* de aislamientos clínicos. *Rev. Argent Microbiol.,* 23:179-

186.

453. **Thabaut A., J. Acar, G. Arlet *et al.*** (1988) [Sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella* spp. to ceftazidime. Current status in France]. *Presse Med.*, 17 (37) :1895-1899.

454. **Thanassi D. G., L. W. Cheng, y H. Nikaido** (1997) Active efflux of bile salts by *Escherichia coli. J. Bacteriol.*, 179 (8) :2512-2518.

455. **Thanassi D. G., G. S. Suh, y H. Nikaido** (1995) Role of outer membrane barrier in efflux-mediated tetracycline resistance of *Escherichia coli. J. Bacteriol.*, 177 (4) :998-1007.

456. **Thomson K. S., C. C. Sanders, y H. Chmel** (1993) Imipenem resistance in *Enterobacter. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 12 (8) :610-613.

457. **Thomson K. S., C. C. Sanders, y J. A. Washington** (1991) High-level resistance to cefotaxime and ceftazidime in *Klebsiella pneumoniae* isolates from Cleveland, Ohio. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 35 (5) :1001-1003.

458. **Thomson Kenneth S. y Christine C. Sanders** (1994) Dissociated resistance among fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 38 (9) :2095-2100.

459. **Thornsberry C**. (1992) Review of the *in vitro* antibacterial activity of cefprozil, a new oral cephalosporin. *Clin. Infect. Dis.*, 14 (Supl 2) :S189-S194.

460. **Thornsberry C., S. D. Brown, Y. C. Yee *et al.*** (1993) *In vitro* activity of cefepime and other antimicrobials: Survey of European isolates. *J. Antimicrob. Chemother.*, 32 (Supl B) :31-53.

461. **Tieleman D. P. y H. J. C. Berendsen** (1998) A molecular dynamics study of the pores formed by *E. coli* OmpF porin in a fully hydrated POPE bilayer. *Biophys. J.*, 74:2786-2801.

462. **Toro C. S., S. R. Lobos, I. Calderón *et al.*** (1990) Clinical isolate of a porinless *Salmonella typhi* resistant to high levels of chloramphenicol. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 34:1715-1719.

463. **Trepanier S., J. R. Knox, N. Clairoux *et al.*** (1999) Structure-function studies of Ser-289 in the class C β-lactamase from *Enterobacter cloacae* P99. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43 (3) :543-548.

464. **Trujillano-Martín I., E. García-Sánchez, I. M. Martínez *et al.*** (1999) *In vitro* activities of six new fluoroquinolones against *Brucella melitensis. Antimicrob. Agents Chemother.*, 43 (1) :194-195.

465. **Truong Q. C., Van JC Nguyen, D. Shlaes *et al.*** (1997) A novel, double mutation in DNA gyrase A of *Escherichia coli* conferring resistance to quinolone antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41 (1) :85-90.

466. **Tsai Chao-Ming y Carl E. Frasch** (1982) Sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 119:115-119.

467. **Tzouvelekis L. S., E. Tzelepi, M. E. Kaufmann *et al.*** (1994) Consecutive mutations leading to the emergence *in vivo* of imipenem resistance in a clinical strain of *Enterobacter aerogenes. J. Med. Microbiol.*, 40 (6) :403-407.

468. **Tzouvelekis L. S., E. Tzelepi, A. F. Mentis *et al.*** (1992) Imipenem resistance in *Enterobacter aerogenes* is associated with derepression of chromosomal cephalosporinases and impaired permeability. *FEMS Microbiol. Lett.*, 74 (2-3) :195-199.

469. **Vaara Martti** (1992) Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol. Rev.*, 56 (3) :395-411.

470. **Vila Jordi, Joaquim Ruiz, Pilar Goñi *et al.*** (1996) Detection of mutations in *parC* in quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli. Antimicrob. Agents Chemother.*, 40 (2) :491-493.

471. **Vila Jordi, Joaquim Ruiz, Pilar Goñi *et al.*** (1997) Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV *parC* gene of *Acinetobacter baumannii. J. Antimicrob. Chemother.*, 39

(6) :757-762.

472. **Vila Jordi, Joaquim Ruiz, Francesc Marco *et al.*** (1994) Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 38 (10) :2477-2479.

473. **Villar H. E., F. Danel, y D. M. Livermore** (1997) Permeability to carbapenems of *Proteus mirabilis* mutants selected for resistance to imipenem or other β-lactams. *J. Antimicrob. Chemother.*, 40 (3) :365-370.

474. **Vincent S., B. Glauner, y L. Gutmann** (1991) Lytic effect of two fluoroquinolones, ofloxacin and pefloxacin, on *Escherichia coli* W7 and its consequences on peptidoglycan composition. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 35 (7) :1381-1385.

475. **von Rosenstiel N. y D. Adam** (1994) Quinolone antibacterials. An update of their pharmacology and therapeutic use. *Drugs*, 47 (6) :872-901.

476. **Wagstaff A. J. y J. A. Balfour** (1997) Grepafloxacin. *Drugs*, 53 (5) :817-824.

477. **Wakebe Hirokazu** (1992) Comparative *in vitro* activities. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 10:2185-2191.

478. **Wang F. D., I. M. Liu, y C. Y. Liu** (1998) Activity of cefepime compared with other antibiotics against gram-positive bacteria and cefuroxime-resistant gram-negative bacteria. *Chung Hua I. Hsueh Tsa Chih (Taipei)*, 61 (7) :408-413.

479. **Watanabe Masato, Matsuhisa Inoue, y Susumu Mitsuhashi** (1989) *In vitro* activity of amifloxacin against outer membrane mutants of the family *Enterobacteriaceae* and frequency of spontaneous resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 33 (11) :1837-1840.

480. **Watanabe Masato, Yasuo Kotera, Yosue Keiko *et al.*** (1990) *In vitro* emergence of quinolone-resistant mutants of *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, and *Serratia marcescens*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 34 (1) :173-175.

481. **Watts J. L. y S. A. Salmon** (1997) Activity of selected antimicrobial agents against strains of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections that produce β-lactamase. *J. Dairy Sci.*, 80 (4) :788-791.

482. **Watts J. L., S. A. Salmon, R. J. Yancey, Jr. *et al.*** (1995) Antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from the mammary glands of dairy heifers. *J. Dairy Sci.*, 78 (7) :1637-1648.

483. **Weigel L. M., C. D. Steward, y F. C. Tenover** (1998) *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance in eight species of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42 (10) :2661-2667.

484. **Werner Vicki, Christine C. Sanders, W. Eugene Sanders (Jr) *et al.*** (1985) Role of β-lactamases and outer membrane proteins in multiple lactam resistance of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 27 (4) :455-459.

485. **Westphal J. F.** (1990) [Cefuroxime axetil, a new oral cephalosporin for treating infections of the ORL field: clinical synthesis]. *Rev. Laryngol. Otol. Rhinol. (Bord.)* , 111 (5) :503-505.

486. **Wharton C. W. y C. J. Szawelski** (1982) Half-time analysis of the integrated Michaelis equation. *Biochem. J.*, 203:351-360.

487. **Wiedemann B. y P. Heisig** (1994) Mechanisms of quinolone resistance. *Infection*, 22 (Supl 2) :S73-S79.

488. **Wiener J., J. P. Quinn, P. A. Bradford *et al.*** (1999) Multiple antibiotic-resistant *Klebsiella* and *Escherichia coli* in nursing homes. *JAMA*, 281 (6) :517-523.

489. **Williams R. J., Y. J. Yang, y D. M. Livermore** (1986) Mechanisms by which imipenem may overcome resistance in gram-negative bacilli. *J. Antimicrob. Chemother.*, 18 (Supl E) :9-13.

490. **Wise R.** (1990) The pharmacokinetics of the oral cephalosporins--a review. *J. Antimicrob. Chemother.*, 26 (Supl E) :13-20.

491. **Wolfson John S., David C. Hooper, Gail L. McHugh *et al.*** (1990) Mutants of *Escherichia coli* K-12 exhibiting reduced killing by both quinolone and β-lactam antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 34 (10) :1938-1943.

492. **Wolfson John S., David C. Hooper, David J. Shih *et al.*** (1989) Isolation and characterization of an *Escherichia coli* strain exhibiting partial tolerance to quinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 33 (5) :705-709.

493. **Woods Gail L. y John A. Washington** (1995) Antibacterial susceptibility test: dilution and disk diffusion methods. *En*: Patrick R. Murray, Ellen Jo Baron, Michael A. Phaller *et al*, eds.: Manual of clinical microbiology. 6ª ed. Washington D. C. 1327-1341.

494. **Xiang X., K. Shannon, y G. French** (1997) Mechanism and stability of hyperproduction of the extended-spectrum β-lactamase SHV-5 in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 40 (4) :525-532.

495. **Xu Chen, B. N. Kreiswirth, S. Sreevatsan *et al.*** (1996) Fluoroquinolone resistance associated with specific gyrase mutations in clinical isolates of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* [erratas publicadas en *J. Infect. Dis.* 1997, 175 (4) :1027]. *J. Infect. Dis.*, 174 (5) :1127-1130.

496. **Yamagishi J., H. Yoshida, M. Yamayoshi *et al.*** (1986) Nalidixic acid-resistant mutations of the *gyrB* gene of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.*, 204 (3) :367-373.

497. **Yamaguchi A., M. Yanai, N. Tomiyama *et al.*** (1986) Effects of magnesium and sodium ions on the outer membrane permeability of cephalosporins in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.*, 208 (1) :43-47.

498. **Yang Y., N. Bhachech, y K. Bush** (1995) Biochemical comparison of imipenem, meropenem and biapenem: permeability, binding to penicillin-binding proteins, and stability to hydrolysis by β-lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.*, 35 (1) :75-84.

499. **Yang Y. y D. M. Livermore** (1989) Interactions of FCE 22101 with class I β-lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.*, 23 (Supl C) :85-94.

500. **Yang Y. J. y D. M. Livermore** (1988) Chromosomal β-lactamase expression and resistance to β-lactam antibiotics in *Proteus vulgaris* and *Morganella morganii*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 9:1385-1391.

501. **Yang Y. J. y D. M. Livermore** (1989) Interactions of meropenem with class I chromosomal β-lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.*, 24 (Supl A) :207-217.

502. **Yang Y. J., D. M. Livermore, y R. J. Williams** (1988) Chromosomal β-lactamase expression and antibiotic resistance in *Enterobacter cloacae*. *J. Med. Microbiol.*, 3:227-233.

503. **Yeh Hung-Yueh y Diane M. Jacobs** (1992) Characterization of lipopolysaccharide fractions and their interactions with cells and model membranes. *J. Bacteriol.*, 174 (1) :336-341.

504. **Yokota T., E. Suzuki, y K. Arai** (1988) Cefpodoxime proxetil, its *in vitro* antibacterial activity, affinity to bacterial penicillin-binding proteins, and synergy of bactericidal activity with serum complement and mouse-cultured macrophages. *Drugs Exp. Clin. Res.*, 14 (8) :495-500.

505. **Yoshida Hiroaki, Mayumi Bogaki, Mika Nakamura *et al.*** (1991) Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 35 (8) :1647-1650.

506. **Yoshimura Fuminobu y Hiroshi Nikaido** (1985) Diffusion of β-lactam antibiotics through the porin channels of *Escherichia coli* K-12. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 27 (1) :84-92.

507. **Yoshimura H., Y. Kosaka, T. Hayashi *et al.*** (1993) The antimicrobial activity *in vitro* of cefpirome and 6 other β- lactam antibacterial agents against clinical isolates. *Jpn. J. Antibiot.*, 46 (10) :877-883.

508. **Zembrzuska-Sadkowska E., W. Parnowska,**

B. Werakso ***et al.*** (1995) Susceptibility of bacteria isolated from non-parenteral preparations applied in paediatric hospitals to antibiotics. *Acta Pol. Pharm.*, 52 (1) :77-85.

509. **Zhanel G. G., J. A. Karlowsky, M. H. Saunders** ***et al.*** (1995) Development of multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants of *Pseudomonas aeruginosa* after serial exposure to fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39 (2) :489-495.